

596

**KOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO**

9600

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN  
PRODUCCIÓN DE FARMOQUÍMICOS

“ESCALAMIENTO A NIVEL FERMENTADOR DE LA OXIDACIÓN  
ENANTIOSELECTIVA DEL ( $\pm$ )-4-CLOROBENCIDROL CON *Nocardia corallina*  
Y EL ESTUDIO CINÉTICO CON CÉLULAS AISLADAS”

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS QUE PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

MARIO ALBERTO RAMÍREZ CAMACHO  
MATRÍCULA 204181494

COMITÉ TUTORAL

Tutor: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ

Asesor: DRA. AÍDA SOLÍS OBA

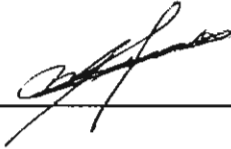
Asesor: DR. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ

JULIO / 2006

“ESCALAMIENTO A NIVEL FERMENTADOR DE LA OXIDACIÓN  
ENANTIOSELECTIVA DEL (±)-4-CLOROBENCIDROL CON *Nocardia corallina*  
Y EL ESTUDIO CINÉTICO CON CÉLULAS AISLADAS”

**COMITÉ TUTORAL**

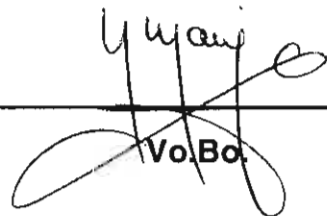
**Tutor: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ**

  
\_\_\_\_\_  
Vo.Bo.

**Asesor: DRA. AIDA SOLÍS OBA**

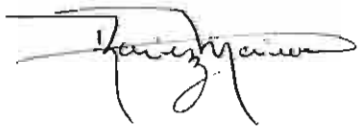
  
\_\_\_\_\_  
Vo.Bo.

**Asesor: DR. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ**

  
\_\_\_\_\_  
Vo.Bo.

**Alumno: MARIO ALBERTO RAMÍREZ CAMACHO**

**Matrícula: 204181494**

  
\_\_\_\_\_

“ESCALAMIENTO A NIVEL FERMENTADOR DE LA OXIDACIÓN  
ENANTIOSELECTIVA DEL (±)-4-CLOROBENCIDROL CON *Nocardia corallina*  
Y EL ESTUDIO CINÉTICO CON CÉLULAS AISLADAS”

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

PRESIDENTE: DR. JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS

VOCAL: DRA. MARÍA MYRNA SOLÍS OBA

SECRETARIO: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ

## RESUMEN.

Actualmente la biotecnología emerge con gran vigor, y su uso se hace necesario para complementar y modernizar los métodos químicos, con el fin de hacerlos más amigables con el ambiente y por supuesto en la generación de nuevos espacios de investigación para la obtención de fármacos y moléculas complejas que difícilmente podrían ser preparados por los métodos tradicionales de síntesis química.

El objetivo principal del presente trabajo es el estudio cinético de la resolución del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol y el escalamiento del proceso de la oxidación enantioselectiva a nivel fermentador.

Para ello se abordó el problema iniciando con el desarrollo de la técnica analítica adecuada que permitiera el seguimiento de la biotransformación, continuando con pruebas para la obtención de condiciones de producción de biomasa y finalmente con el estudio cinético del proceso de biotransformación con células en reposo y el proceso de biotransformación en fermentador de 3 litros.

Los resultados mostraron que la oxidación del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol con células en reposo de *Nocardia corallina* B-276 procedió de manera enantioselectiva (matraz Erlenmeyer), siendo la relación sustrato:células 1:100 y 0.6% de DMF, con la que se obtuvo el mayor porcentaje de conversión a cetona (44.25%) y una relación enantiomérica *R/S* de 95.13%/4.87%, con un tiempo de biotransformación de 34 horas. La oxidación del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol en fermentador de 3 litros procedió de manera enantioselectiva, obteniéndose un porcentaje de conversión a cetona del 17.08% y una relación enantiomérica *R/S* 85.18%/14.82% a las 48 horas de biotransformación, con una relación estimada de sustrato:células 1:100 p/p, 0.6% de DMF y 100 mL de *n*-octano.

Se obtuvieron las condiciones óptimas para el crecimiento de la biomasa en el fermentador: 226rpm, T=30°C, volumen de trabajo=2.2 L y vvm=0.9.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante un año correspondiente al proyecto 37272-N, así como la beca otorgada durante el período enero/2005 a diciembre/2005 con número de registro 194960, para el desarrollo de este proyecto.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

En este breve espacio quiero plasmar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me apoyaron en la realización de este proyecto y que creyeron en mí para su culminación.

A mis dos grandes amores y razón de existir, Mireya y Alberto, por su amor, comprensión y apoyo durante el tiempo que emplee en la realización de esta tesis.

A mis padres, Mario y Yolanda, por darme la vida, por su apoyo incondicional, comprensión y paciencia durante estos años.

A mis hermanos, Yolanda, Carmen, Víctor y Felipe, por existir, por su apoyo en los momentos difíciles, por aguantar mi histeria y por los momentos divertidos a su lado.

A mis sobrinos, Arturo y Eric, por sus inmensas sonrisas y alegría.

A mi querida tutora de tesis: Dra. Herminia Inés Pérez Méndez, por su infinita paciencia, apoyo incondicional, su cariño, por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente y como ser humano.

A mis asesores de tesis: Dra. Aída Solís Oba y Dr. Norberto Manjarrez Álvarez, así como al Dr. Héctor Luna Contra, por su valioso apoyo, colaboración, sugerencias, desarrollo y evaluación de este trabajo.

A mi generación, Toño (chiquito my flower), Raziel (chiquito my lover), Richard (chiquito my longer), por su amistad, por su apoyo, por su calidad humana y por los momentos inmemorables que compartimos.

A mis amigos de aquí y de allá: David, Alejandro, Ángeles, Honorato, Emmanuel, César, Lalo, Chabelita, Erick, Mónica, Paty, Marisol, Pato, Liliana, Héctor, Catalina, Zaida, Fernando, Gladis, Eva, Luisa, Cony, Artemio, Ricardo,

Alma, Susana, Jorge, Evelyn, Ivonne, Estrella, Nancy, Edgar y a todos los demás que por el momento sus nombres se me escapan, por su amistad, su paciencia, su apoyo y por los maravillosos momentos vividos en su compañía.

A los investigadores, Dra. María Myrna Solís Oba y Dr. Ignacio Regla Contreras por su valioso apoyo, colaboración y sugerencias en el desarrollo de este trabajo.



## ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.	1
2.- ANTECEDENTES.	3
2.1 Biotransformación.	3
2.2 Ventajas y desventajas de los procesos de biotransformación.	3
2.3 Tipos de reacciones de biotransformación.	5
2.4 Procesos de biotransformación.	5
2.5 Aplicación de los procesos de biotransformación.	6
2.6 Biotransformaciones en la industria farmacéutica.	8
2.7 Enzimas, elemento clave en los procesos de biotransformación.	8
2.8 Clasificación de las enzimas.	8
2.9 Enzimas en síntesis asimétrica.	9
2.10 <i>Nocardia corallina</i> .	10
2.10.1 Descripción morfológica de actinomicetos.	11
2.10.2 Distribución y abundancia de los actinomicetos.	12
2.10.3 Taxonomía de los actinomicetos.	12
2.10.3.1 Género: <i>Nocardia</i> ; morfología y coloración.	13
2.10.3.2 Fisiología de <i>Nocardia</i> .	14
2.11 Escalamiento de procesos.	15
2.12 Transferencia de oxígeno.	17
2.13 Determinación experimental de la transferencia de oxígeno.	18
2.13.1 Técnica dinámica (régimen no estacionario).	19
2.14 Oxidación microbiológica.	20
2.15 Oxidación química de alcoholes.	24



6.4.1 Procedimiento General para la Biotransformación del (±)-4-clorobencidrol con Células en Reposo.	42
6.5 Proceso de biotransformación en fermentador de 3 litros.	43
6.5.1 Procedimiento General para la Biotransformación del (±)-4-clorobencidrol en el fermentador de 3 L.	44
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	46
7.1 Método analítico.	46
7.2 Condiciones de producción de biomasa.	53
7.3 Estudio cinético del proceso de biotransformación con células en reposo.	57
7.4 Proceso de biotransformación en fermentador de 3 litros.	68
8. CONCLUSIONES.	73
9.- REFERENCIAS.	74
10.- ANEXOS.	78

## 1. INTRODUCCIÓN.

Los compuestos quirales han sido estudiados desde mediados del siglo XIX. Actualmente estos compuestos son motivo de legislaciones particulares en el área médica, así mismo ha cobrado gran importancia el desarrollo de técnicas analíticas especiales para llevar a cabo su identificación y cuantificación<sup>(1)</sup> y en la búsqueda de nuevas metodologías, principalmente biotecnológicas, con el fin de obtener compuestos enantiopuros.

La quiralidad es un factor determinante en la eficacia de muchos fármacos, agroquímicos y aditivos alimentarios, pues de ella depende su actividad biológica

Los fármacos para tener un efecto terapéutico, deben ser capaces de interaccionar y tener cierta afinidad con sus receptores, dicho efecto depende entre otros factores de la estructura química, distancias interatómicas y de la presencia o ausencia de grupos funcionales<sup>(2)</sup>.

Los enantiómeros de un fármaco, aunque poseen las mismas propiedades físicas, poseen generalmente propiedades biológicas distintas, esto se debe a la quiralidad que presentan y por lo tanto a una diferencia en las interacciones que forman con los receptores. Por lo anterior uno de los enantiómeros de un fármaco quiral pueden presentar varios problemas, como<sup>(3, 4)</sup>:

- 1.- Actividad terapéutica nula
- 2.- Actividad terapéutica no deseada
- 3.- Actividad terapéutica insuficiente – dosis medicamentosas insuficientes.
- 4.- Efectos terapéuticos adversos

En la actualidad, se estima que aproximadamente el 50% de los 700 fármacos más prescritos, contienen al menos un centro estereogénico y el 90% de estos se comercializan como mezclas racémicas<sup>(1,5)</sup>.

Los compuestos enantiopuros pueden producirse por métodos químicos o químico-enzimáticos. Los procesos biocatalíticos son los preferidos, debido a que

las reacciones catalizadas por enzimas, generalmente son regio, quimio y estereoselectivas<sup>(6)</sup>.

En este momento en nuestro país se están analizando y promoviendo elementos para la elaboración de una política farmacéutica integral <sup>(5)</sup>, en ese contexto se reconoce la necesidad de recuperar la fortaleza que tuvo la industria de farmoquímicos en México, por considerarse estratégica para el desarrollo de nuestro país. Asimismo la biotecnología emerge con gran vigor, su uso se hace necesario para complementar y modernizar los métodos químicos, para hacerlos más amigables con el ambiente y por supuesto generar nuevos espacios de investigación para la obtención de fármacos y moléculas complejas que difícilmente podrían ser preparados por los métodos tradicionales de síntesis química.

Así, en la presente investigación convergen tres disciplinas: Química Orgánica, Química Analítica y Microbiología.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la oxidación enantioselectiva del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol con *Nocardia corallina*, el estudio cinético de dicho proceso con las células aisladas y el escalamiento a nivel fermentador.

Lo anterior con el objetivo de preparar un intermediario importante para la obtención de farmoquímicos quirales, trabajando en la dirección de generar conocimiento para la integración de futuros procesos de producción.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1 Biotransformación.**

La biotransformación o bioconversión, es un proceso biológico, en el cual un sustrato es modificado a un producto recuperable, mediante reacciones catalizadas por enzimas.

Las enzimas pueden provenir de células microbianas, vegetales o animales, siendo las microbianas superiores en varios aspectos, por ejemplo, su alta relación superficie-volumen les confiere un crecimiento rápido y altas velocidades de metabolismo, que conducen a la eficiente transformación de los sustratos que se le añaden.

Además el mundo microbiano es rico en especies, lo cual proporciona un variado surtido de enzimas para una gran variedad de reacciones sobre diversas clases de compuestos, así mismo los microorganismos fácilmente se adaptan al ambiente artificial impuesto por los requerimientos técnicos y económicos. Los sustratos para ser transformados pueden añadirse a células en crecimiento, células en reposo, esporas, células desecadas o a enzimas aisladas de estas células; a su vez los agentes transformantes pueden estar suspendidos en un medio en biorreactores aireados y agitados, o empaquetados en columnas para operar continuamente, incluso inmovilizados sobre soportes sólidos para aumentar su estabilidad y prolongar el tiempo de operación<sup>(7)</sup>.

### **2.2 Ventajas y desventajas de los procesos de biotransformación.**

Durante las tres últimas décadas, los procesos de biotransformación se han considerado como una importante alternativa en la síntesis de productos orgánicos, sin embargo como todo proceso presenta ventajas y desventajas con respecto a los procesos aplicados en química clásica.

## Ventajas

- Las reacciones biocatalizadas causan menos daño al ambiente, ya que tienen lugar principalmente en agua. Además, los productos de reacción son biodegradables, incluso la enzima en si misma cuando se desnaturaliza o por alguna razón se desea desechar, su disposición final no causa problema alguno como en el caso de los catalizadores químicos que generalmente no son biodegradables
- Condiciones suaves de reacción: Las biotransformaciones se llevan a cabo generalmente a temperatura ambiente y presión atmosférica, evitando con ello el uso de condiciones de reacción extremas, que pueden causar isomerizaciones, racemizaciones, epimerizaciones o transposiciones. Por otro lado, al requerir condiciones de operación suaves el consumo energético es mucho menor que en los procesos químicos, esta es una enorme ventaja que se vera aumentada en las décadas posteriores debido al alza en el precio de los energéticos.
- Combinación de reacciones: Varias reacciones se pueden combinar en una etapa del proceso de biotransformación, utilizando un microorganismo con un adecuado sistema enzimático, o mediante conversiones escalonadas utilizando diferentes microorganismos.
- Especificidad del sustrato: Normalmente una enzima cataliza solamente la transformación de un tipo de sustrato.
- Especificidad de sitio (regioespecificidad): Si en una molécula existieran varios grupos funcionales de un tipo determinado, se afectaría solamente una posición específica.
- Estereoespecificidad: En presencia de una mezcla racémica como material de partida, solamente un enantiómero es convertido.
- Mayor aplicación: Las biotransformaciones también encuentran aplicación en la preparación de algunos compuestos en los que la transformación química es, por el momento, imposible.

## Desventajas

- El empleo de altas diluciones y el uso de costosos cofactores.
- La limitada estabilidad térmica y su incompatibilidad con algunos disolventes orgánicos.
- En algunos casos los procesos de biotransformación tienen rendimientos bajos.
- Altos costos de implementación de los procesos a escala industrial<sup>(6)</sup>.

## 2.3 Tipos de reacciones de biotransformación.

Las biotransformaciones pueden ser agrupadas desde el punto de vista químico en las siguientes categorías: oxidación, reducción, hidrólisis, condensación, isomerización, formación de enlaces C-C e introducción de otros grupos funcionales.

Las reacciones de oxidación enantioselectiva son potencialmente útiles en la industria. Teniendo menor aplicación industrial, las reacciones de: isomerización, reducción, hidrólisis y condensación<sup>(8)</sup>.

## 2.4 Procesos de biotransformación.

En la biotransformación de compuestos orgánicos pueden ser utilizados sistemas de esporas, cultivos en crecimiento, células en reposo, enzimas, células inmovilizadas o enzimas inmovilizadas.

En los procesos con cultivos en crecimiento, la cepa utilizada se cultiva en un medio adecuado y después de 6-24hrs de crecimiento se añade una solución concentrada de sustrato. Una variante de este procedimiento es emplear un inóculo muy grande y añadir el sustrato concentrado inmediatamente, sin permitir un periodo de crecimiento.

Para la biotransformación de compuestos lipofílicos es posible emplear un sistema polifásico. A la fase acuosa, que contiene el material celular o la enzima, se le adiciona un disolvente orgánico inmiscible en agua en el que se ha disuelto



el sustrato. El sustrato pasa lentamente a la fase acuosa y a medida que continúa la reacción de transformación el producto revierte a la fase orgánica. En algunos casos la transformación se produce realmente en la interfase, entre las fases, acuosa y orgánica.

Las reacciones de oxidación y de reducción catalizadas por bacterias frecuentemente son completadas en unas pocas horas, mientras que éstas conversiones utilizando levaduras y especialmente con hongos pueden llevar varios días.

Si no es necesaria la inducción de la enzima por el sustrato que se añade, pueden ser utilizados sistemas de células sin crecimiento. Esto tiene la considerable ventaja de que se elimina la inhibición del crecimiento por el sustrato. Pueden ser utilizadas altas densidades de células, lo que favorece el aumento de productividad; al mismo tiempo se reduce el riesgo de contaminación. Puesto que la reacción de transformación se produce predominantemente en la solución del tampón, la recuperación del producto es relativamente sencilla. En otros procesos se utilizan células inmovilizadas, lo que ofrece la ventaja de que el proceso pueda ser llevado a cabo continuamente y las células puedan ser utilizadas una y otra vez<sup>(8)</sup>.

## **2.5 Aplicación de los procesos de biotransformación.**

Durante muchos años el empleo de enzimas o células completas ha sido de gran importancia en distintos sectores de la industria para la preparación de compuestos de gran interés comercial, por ejemplo en la industria de alimentos y bebidas, para la producción de cerveza, queso o en la producción de saborizantes, su uso no solamente se limita a este sector, siendo la industria cosmética, farmacéutica y en los procesos de biorremediación otros de los beneficiados al emplear los procesos de biotransformación.

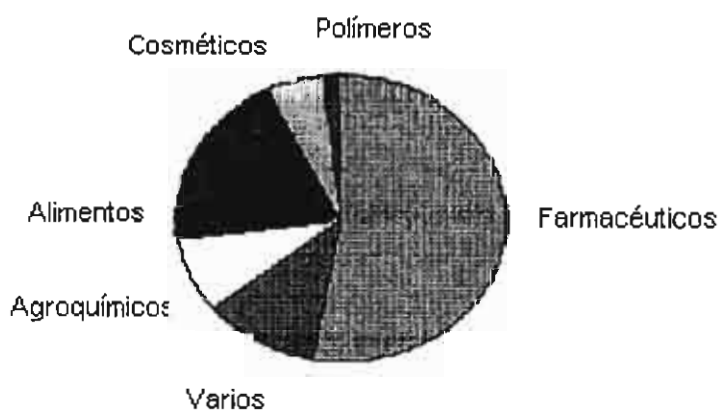
Los procesos fermentativos han provisto a la industria las herramientas adecuadas para la producción de varios compuestos de alto valor comercial, como son los aminoácidos, el ácido cítrico y otros aditivos alimenticios, hoy en día estos

productos se obtienen mediante procesos enzimáticos, otro ejemplo es la producción de fructosa donde se emplea una isomerasa, lo cual ha incrementado la producción de la fructosa y disminuído su costo de producción. A pesar de esto, no es sino hasta hace 30 años que el uso de enzimas en la síntesis de compuestos en química fina ha tomado mayor importancia y relevancia.

Las estearasas y lipasas son las más empleadas para catalizar reacciones de hidrólisis y esterificación, actualmente estas enzimas se encuentran disponibles comercialmente. Las epoxihidrolasas, nitrilasas y nitrilo hidratasas se han estudiado y comienzan a ser explotadas. Las reacciones de oxidación que involucran monooxigenasas, dioxigenasas y oxidoreductasas son empleadas en procesos industriales por laboratorios especializados en el área<sup>(9)</sup>.

El número total de procesos de biotransformación que se emplean a escala industrial ha crecido rápidamente durante la última década y la expectativa es que dicho crecimiento continúe en los siguientes años, siendo empleados mayormente en la obtención de compuestos naturales y sus derivados, teniendo en el sector de la industria farmacéutica el mayor campo de aplicación<sup>(10)</sup>.

Figura 1. Sectores industriales donde se emplean productos obtenidos a partir de biotransformaciones industriales. (basado en 134 procesos)<sup>(10)</sup>



## **2.6 Biotransformaciones en la industria farmacéutica.**

Desde la década de los 90's los procesos de biotransformación han sido empleados por las compañías farmacéuticas como parte de sus programas de desarrollo de nuevos fármacos, llevando la producción a escalas entre 1 a 100 kg, la pequeña escala de estos procesos se debe a que han tenido como propósito principal la producción de fármacos empleados en ensayos clínicos u otros propósitos que requieren solo una pequeña cantidad y cortos períodos de producción<sup>(10)</sup>.

## **2.7 Enzimas, elemento clave en los procesos de biotransformación.**

Una enzima es una proteína, que funciona como un catalizador aumentando la velocidad de la reacción.

En general, una enzima cataliza sólo un tipo de la reacción (selectividad de reacción) y actúa sobre sólo un tipo de sustrato (selectividad del sustrato). Las moléculas del sustrato son transformadas en una misma posición (regioselectividad) y solo uno o preferentemente uno de los enantiómeros de una mezcla racémica es transformado (enantioselectividad)<sup>(11)</sup>.

## **2.8 Clasificación de las enzimas.**

Las enzimas catalizan un gran número de reacciones necesarias para la síntesis, modificación y degradación de compuestos orgánicos que constituyen a los seres vivos, o que son producidas por estos para protección o comunicación. Los procesos metabólicos y de crecimiento celular involucran una gran variedad de reacciones enzimáticas tales como la formación de uniones carbono-carbono, enlaces tipo éster, saturación/insaturación de enlaces carbono-carbono, reacciones de oxidación, formación de péptidos, entre otras. Las enzimas responsables de estas reacciones han sido agrupadas de acuerdo a sus propiedades catalíticas en seis clases diferentes<sup>(12,13)</sup>:

- Oxidoreductasas: catalizan reacciones de óxido-reducción, involucrando oxigenación, remoción o adición de átomos de hidrógeno a un esqueleto hidrocarbonato.
- Transferasas: Transfiere grupos acilo, glucosilo, fosfatos y equivalentes de aldehídos y cetonas de una molécula a otra.
- Hidrolasas: Hidrólisis de grupos como glucósidos, anhídridos, ésteres, amidas, péptidos, epóxidos y otras funcionalidades que contienen el enlace C-N.
- Liasas: Catalizan adición o eliminación de moléculas pequeñas en uniones C=C, C=N y C=O.
- Isomerasas: Catalizan transformaciones geométricas o estructurales en una molécula tales como: racemizaciones, epimerizaciones, isomerizaciones, tautomerizaciones, mutaciones o cicloisomerizaciones.
- Ligasas: También llamadas sintetetasas, median la formación de enlaces C-O, C-S, C-N, C-C y enlaces de ésteres de fosfatos.

## **2.9 Enzimas en síntesis asimétrica.**

Existen dos modalidades principales de emplear las enzimas en síntesis asimétrica:

- 1.- Enzimas aisladas: Como tales o inmovilizadas sobre diversos soportes, lo cual permite emplear medios con una mínima cantidad de agua, haciéndose así posible el uso de una mayor variedad de sustratos.
- 2.- Células completas: Al emplear este método se dispone de la ventaja de que los cofactores son reciclados por el propio sistema celular. La principal limitación reside en la necesidad de que el sustrato sea soluble en los medios de cultivo acuosos y sea captado al interior de la célula. Además de que no se requiere en este caso de la purificación de enzimas, que generalmente representa costos elevados.

Las enzimas se utilizan en procesos de resolución cinética, en los cuales la enzima actúa sobre una mezcla racémica y cataliza más eficazmente la reacción de uno de los dos enantiómeros, transformándolo y permitiendo su separación.

Otro tipo de procesos en los que las enzimas son de gran utilidad son los denominados procesos de asimetrización que permiten transformar un compuesto *meso* en un compuesto quiral. También en reacciones asimétricas sobre carbonos proquirales como la adición del ión cianuro a aldehídos o cetonas para formar cianohidrinadas.

El uso de enzimas como biocatalizadores ha adquirido una gran importancia en la preparación de compuestos orgánicos. La biocatálisis puede ser usada para la preparación de manera regioselectiva o enantioselectiva de compuestos que no se pueden preparar por métodos químicos convencionales; esta metodología permite llevar a cabo diferentes reacciones químicas sin la necesidad de pasar por etapas de protección y desprotección. Por otra parte, la alta selectividad de las biotransformaciones conduce a la preparación de productos con altos rendimientos sin la formación de productos secundarios, que a veces resulta muy difícil su separación. Las ventajas en la preparación de fármacos ha quedado puesta de manifiesto en los últimos años porque permite la resolución y síntesis de fármacos a través de procedimientos que no dañan al medio ambiente. Por otra parte, el poder llevar a cabo reacciones con enzimas en medio orgánico, junto con la amplia especificidad de sustrato que presentan algunos de estos biocatalizadores, ha conducido que en el sector farmacéutico se vea incrementado en los últimos años el número solicitado de patentes con esta metodología, desplazando a los métodos químicos convencionales, especialmente aquellos que utilizan oxidaciones<sup>(14)</sup>.

### **2.10 *Nocardia corallina*.**

Dentro del género *Nocardia*, perteneciente al orden de los actinomicetos, se encuentra la *Nocardia corallina*, una bacteria gram positiva aerobia obligada que es capaz de crecer en presencia de una variedad de fuentes de carbono, como alcanos, alquenos<sup>(15)</sup> y nitrilos<sup>(16)</sup>.

### 2.10.1 Descripción morfológica de actinomicetos.

Los actinomicetos y microorganismos relacionados probablemente representan el grupo de bacterias más grande y diverso. Este grupo está conformado por microorganismos gram positivos, unicelulares, en forma de bacilos y microorganismos filamentosos. Los actinomicetos comprenden al grupo *Corineforme* y al orden de los Actinomicetales.

El orden de los actinomicetos comprende 63 géneros y casi todos sus miembros desarrollan un micelio filamentosos. Esta última estructura puede permanecer unida a la superficie del sustrato, al cual se le denomina micelio sustrato, o bien, desarrollarse hacia la parte externa en cuyo caso se denomina micelio aéreo. Los filamentos individuales o hifas del micelio se subdividen en unidades, producto de un crecimiento de la pared celular hacia el interior de la hifa en intervalos regulares a lo largo de esta estructura. A este proceso se le denomina septación y cada una de las septas resultantes contiene una molécula de DNA.

Una característica particular de los actinomicetos es que la reproducción lleva a la formación de esporas que son producidas en hifas especializadas, muchas de las cuales se desarrollan sobre el filamento aéreo. De manera general, estas estructuras carecen de movilidad aunque algunos géneros producen esporas flageladas. Las esporas producidas por la mayoría de las especies no son resistentes al calor.

La mayoría de los actinomicetales son aerobios (actinomicetos oxidativos), aunque algunos de ellos son anaerobios facultativos u obligados (actinomicetos fermentativos)<sup>(17)</sup>.

### **2.10.2 Distribución y abundancia de los actinomicetos.**

Los actinomicetos se encuentran distribuidos en diferentes hábitats incluyendo estiércol, fango de los ríos y el fondo de los lagos, sin embargo su reservorio natural es el suelo, en donde su función ecológica principal es la descomposición de la materia orgánica. Los actinomicetos comprenden aproximadamente el 20-60% de la población microbiana del suelo, el olor característico a tierra húmeda se debe a su actividad metabólica y a la producción de pigmentos, terpenoides (geosminas) y enzimas extracelulares que son capaces de degradar materia orgánica de origen vegetal y animal. Algunas otras especies son patógenas para los humanos, animales o plantas o son fijadoras de nitrógeno.

Además de la función ecológica de los actinomicetos, estos microorganismos son de suma importancia debido a que han demostrado ser la fuente más importante de metabolitos secundarios bioactivos de valor industrial y comercial.

Muchos de los productos naturales microbianos de importancia económica se obtienen a partir de actinomicetos, estimándose que aproximadamente el 68% de estos productos son biosintetizados por actinomicetos del género *Streptomyces*. Sin embargo, otros géneros entre los que destacan *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinoplanes*, *Streptoverticillium* y *Actinomadura* son fuentes valiosas de metabolitos bioactivos de aplicación terapéutica y agroquímica <sup>(17)</sup>.

### **2.10.3 Taxonomía de los actinomicetos.**

Actualmente se sabe que los suelos contienen gran cantidad de actinomicetos, de géneros característicamente diferentes, estos se pueden dividir en las siguientes familias:

- I. *STREPTOMYCETACEAE*. Hifas generalmente no fragmentadas. Extenso micelio aéreo y cadenas de esporas con 5 a 50 o más conidias por cadena. Géneros: *Streptomyces*, *Microeliobosporia*, *Sporichthya*.
- II. *NOCARDIACEAE*. Hifas característicamente fragmentadas que producen pequeñas estructuras redondeadas o alargadas. Géneros: *Nocardia*, *Pseudonocardia*.
- III. *MICROMONOSPORACEAE*. Hifas no fragmentadas. Conidias aisladas, en pares o en cadenas cortas. Géneros: *Micromonospora*, *Microbispora*, *Micropolyspora*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Actinobifida*.
- IV. *ACTINOPLANACEAE*. Esporas formadas en esporangios. El diámetro de las hifas puede ser de 0.2 a más de 2.0  $\mu\text{m}$ . Géneros: *Streptosporangium*, *Actinoplanes*, *Planobispora*, *Dactylosporangium*.
- V. *DERMATOPHILACEAE*. Los fragmentos hifales se dividen para formar gran número de estructuras redondas, móviles. Género: *Geodermatophilus*.
- VI. *FRANKIACEAE*. Habita en los nódulos de las raíces de algunas plantas no leguminosas. No crecen fuera de la planta hospedera. Género: *Frankia*.
- VII. *ACTINOMYCETACEAE*. No producen micelios verdaderos. Por lo general son desde anaerobios estrictos a facultativos. Género: *Actinomyces*.

#### 2.10.3.1 Género: *Nocardia*; morfología y coloración.

Las especies de *Nocardia* son bacilos gram positivos aerobios y parcialmente ácidosresistentes. Dentro del género la formación de filamentos y la ramificación están muy desarrolladas. Las especies de *Nocardia* producen filamentos profundos y aéreos (también denominados hifas o micelios) de alrededor de 1  $\mu\text{m}$  de ancho. Las células de los filamentos profundos se separan en formas de rosario y los filamentos aéreos experimentan fragmentación para



producir células similares a esporas unicelulares que se dispersan y forman aerosoles con facilidad.

Al igual que los *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium*, las paredes de la *Nocardia* poseen ácidos micólicos, estos son ácidos grasos largos  $\beta$ -hidroxilados y  $\alpha$ -ramificados, por lo común saturados o monoinsaturados. Tienen alrededor de 50 carbonos de largo, en tanto que los ácidos corinomicólicos tienen de 23 a 36 carbonos. Las especies de *Corynebacterium* no son ácidosresistentes y las de *Nocardia* presentan una ácidosresistencia débil o parcial cuando se tiñen con carbolfucsina, de acuerdo con el método de Kinyoun<sup>(18)</sup>. Si se decoloran con ácido sulfúrico del 1 al 4% en lugar del decolorante más fuerte, la mayor parte de las cepas de *Nocardia* presentaran ácidosresistencia<sup>(17,19)</sup>.

### **2.10.3.2 Fisiología de *Nocardia*.**

*Nocardia* prolifera con facilidad y rapidez en diversos medios de cultivo. En los que contienen agar las colonias aparecen dentro de los tres días siguientes a la inoculación. Después de siete a diez días se presentan colonias apiladas, irregulares, cerosas, brillantes y de varios milímetros de diámetro. A medida que se forman los filamentos aéreos la superficie de la colonia se torna opaca y vellosa.

*Nocardia* puede diferenciarse de géneros similares por su capacidad para descomponer y utilizar la parafina como una fuente de carbono y energía. Esta propiedad permite el aislamiento selectivo de *Nocardia* de cultivos mixtos.

Un método para "atrapar" *Nocardia* implica el uso de varillas de vidrio recubiertas de parafina que se preparan al sumergir una varilla de vidrio en parafina fundida. Las varillas pueden colocarse en suelos o agua del medio ambiente y las especies de *Nocardia*, si están presentes, se desarrollaran alrededor de la varilla de vidrio recubierta con parafina. Usando esta técnica se han aislado especies patógenas y saprófitas de *Nocardia* de una amplia variedad de suelos, agua dulce y agua de mar en todo el mundo. Además de la digestión de la parafina, las especies de *Nocardia* producen catalasa y ureasa<sup>(17,19)</sup>.

## 2.11 Escalamiento de procesos.

En el desarrollo de un proceso, ya sea fermentativo o de cualquier otra índole, el escalamiento es uno de los pasos de mayor importancia para asegurar la rentabilidad y productividad de dicho proceso, ya que involucra variables desde el diseño del equipo, sistemas auxiliares a emplear, factores técnicos y factores económicos.

En el caso de las biotransformaciones aeróbicas el predecir resultados a escala de producción, basados en el escalamiento de datos obtenidos en el laboratorio requiere de un análisis cuidadoso tanto de las variables fisicoquímicas como biológicas.

De acuerdo con la capacidad del fermentador se pueden clasificar las escalas como se muestra en la tabla 1, así como conocer los rangos de operación más comunes en lo que se refiere a potencia por unidad de volumen y a velocidad de agitación<sup>(20)</sup>.

Tabla 1. Clasificación de escalas

Escala del fermentador	Potencia de trabajo W/L*	Capacidad del fermentador (litros)	Velocidad de agitación (rpm)
Escala pequeña	8-10	3	200-2000
Escala piloto	3-5	10	200-1200
Escala industrial	1-3	50	100-800
		200	50-400
		500	50-300

\*W= Watt, L=litro

Cuando en el escalamiento se pretenden trasladar las condiciones de operación de un equipo a otro, o de una escala a otra, es importante establecer que la relación entre las variables: potencia/volumen, revoluciones por minuto cantidad de aire por minuto sean similares.

El control ambiental y su escalamiento dependen por lo tanto de las limitaciones del equipo. Usualmente es la transferencia de oxígeno la que determina la capacidad operativa de un fermentador y es por ello que debe de tomarse como un criterio para el escalamiento.

La transferencia de oxígeno puede establecerse de la siguiente manera:

Velocidad de transferencia de  $O_2 = K_L a (C^*g - C_L)$  promedio

Velocidad de transferencia de  $O_2 = Q_{O_2} x$

Donde:

$K_L a$  = coeficiente volumétrico de transferencia de masa ( $h^{-1}$ ).

$C^*g$  = concentración del oxígeno disuelto en equilibrio con el oxígeno de fase gaseosa.

$C_L$  = concentración de oxígeno disuelto.

$Q_{O_2}$  = demanda específica de oxígeno ( $mmol O_2 / g \text{ células-h}$ )

$x$  = concentración celular ( $g/L, mg/mL$ )

Los criterios más adecuados para pasar de una escala a otra son mantener la relación P/V (potencia/volumen) constante y  $K_L a$  constante. Sin embargo el uso del  $K_L a$  presenta algunas dificultades por las siguientes razones:

- a) Cambio durante el transcurso de la fermentación, debido al aumento de la viscosidad del medio, aumento de la concentración de células y por problemas de formación de espuma.
- b) Las correlaciones de  $K_L a$  solo son válidas en ciertos rangos de operación y para geometrías del fermentador particulares.
- c) El método por el cual se determina el  $K_L a$ .

La ubicación del electrodo de oxígeno disuelto es otro punto que debe de considerarse en el escalamiento, ya que este deberá colocarse en una posición en donde mida la concentración de oxígeno disuelto del volumen activo. También habrá de considerarse la transferencia de calor, ya que a medida que el fermentador aumenta de tamaño, el área de enfriamiento o calentamiento disminuye <sup>(21)</sup>.

## 2.12 Transferencia de oxígeno.

En los procesos aeróbicos es necesario un suministro adecuado de oxígeno, que satisfaga los requerimientos metabólicos de los microorganismos empleados, por ello es indispensable conocer los requerimientos de oxígeno del cultivo, para asegurarse de que su suministro es suficiente.

Al evaluar la transferencia de oxígeno, es necesario conocer y calcular las resistencias a la transferencia que encuentra el oxígeno antes de llegar a la célula, las resistencias están determinadas por los obstáculos que se oponen a la transferencia, estas son:

- 1- En la película gaseosa (para gases muy solubles ej.  $\text{NH}_3$ )
- 2- En la interfase gas-líquido
- 3- En la película líquida (para gases poco solubles ej.  $\text{O}_2$ )
- 4- En el seno del líquido
- 5- En la película líquida que rodea al sólido
- 6- En la interfase líquido- sólido
- 7- En la fase sólida conteniendo las células

## 8- En los sitios de la reacción bioquímica

Se ha demostrado que en el caso de organismos unicelulares, la mayor resistencia la opone la película del líquido que rodea las burbujas, pero en los agregados celulares, el paso limitante es la difusión a través del agregado mismo (22).

### 2.13 Determinación experimental de la transferencia de oxígeno.

Existe una gran variedad de métodos para medir la capacidad de transferencia de oxígeno en un fermentador, todas estas técnicas se basan en un balance de oxígeno, ya sea de todo el sistema o de la fermentación en particular, el balance se representa mediante la siguiente fórmula que muestra el cambio de la concentración de oxígeno respecto al tiempo.

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C^* - C_L) - Q_{O_2} X$$

Donde:

dC = diferencial de concentración de oxígeno

dt = diferencial del tiempo

Las técnicas utilizadas más comúnmente se basan en dos tipos de medición:

Medición indirecta

- 1.- Oxidación de sulfito
- 2.- Técnica de eliminación de gas

Medición directa

- 1.- Balance de oxígeno en el sistema

## 2.- Técnica dinámica (régimen no estacionario)

Al emplear los métodos de medición directa, se tiene la ventaja que se realizan bajo condiciones reales de operación y por tanto los valores obtenidos son más representativos del sistema en estudio.

### 2.13.1 Técnica dinámica (régimen no estacionario).

Propuesto por Taguchi y Humphrey<sup>(23)</sup>, en este método se introduce una perturbación en el sistema (interrupción de la aireación o de la agitación) por lo que este responde modificando  $C_L$  y, de esta variación puede calcularse el  $K_La$ .

Condición: La medición de la concentración de oxígeno debe efectuarse en forma rápida, de modo que los parámetros fisiológicos (respiración) y cinéticos (biomasa,  $C_L$ ,  $C^*g$ ) puedan considerarse constantes.

Ventajas.

- La determinación se hace *in situ*
- Solo requiere un electrodo de oxígeno
- Puede calcularse el  $C^*g$

Limitaciones.

- Se requiere un electrodo de respuesta rápida
- El  $K_La$  que se calcula es puntual
- Hay errores dados por:
  - tiempo de respuesta del electrodo
  - transferencia de oxígeno desde la superficie.

## 2.14 Oxidación microbiológica.

La aplicación de las biotransformaciones son muy variadas y los sustratos pueden ir desde hidrocarburos hasta compuestos polifuncionales, en todos estos casos la oxidación y la estereoquímica generada son factores de estudio<sup>(24)</sup>. Se han empleado diversos microorganismos para realizar oxidaciones sobre una gran variedad de sustratos, los cuales ocurren con químio-, regio- o estereoselectividad, difícil de alcanzar con los métodos químicos convencionales<sup>(25)</sup>.

Muchas bacterias, levaduras y hongos filamentosos son capaces de oxidar y metabolizar diversos compuestos químicos. Entre ellas se encuentran especies de los géneros *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Candida* y algunos Actinomicetos. El genero *Nocardia* ha sido utilizado ampliamente para la epoxidación microbiológica de alquenos, siendo *Nocardia corallina* la que ha proporcionado los mejores resultados<sup>(26)</sup>. Luna y colaboradores<sup>(27)</sup>, informaron el potencial uso de estos microorganismos (*Pseudomonas*, *Nocardia*), para transformar alcoholes alílicos a los correspondientes aldehídos/ácidos o cetonas, siendo los de *Nocardia corallina* los de mayor interés, también informaron sobre la oxidación de dioles a lactonas quirales; lográndose preparar compuestos de alta pureza óptica, con la oxidación preferencial del grupo pro-S.

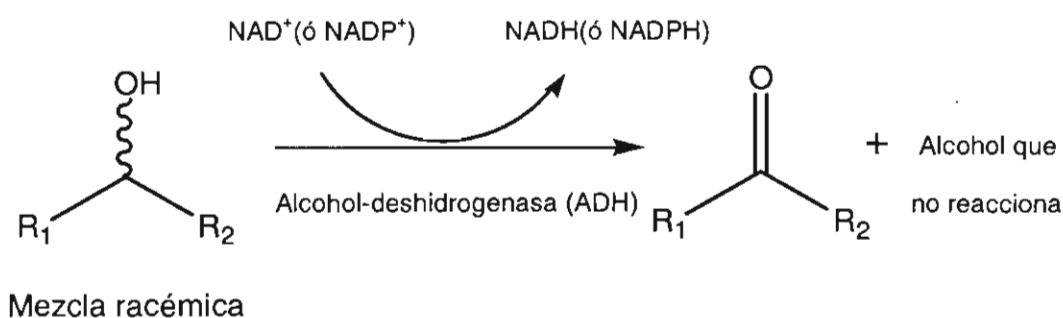
La oxidación microbiológica de alcoholes primarios y secundarios a sus aldehídos y cetonas respectivamente, son reacciones químicas comunes que raramente presentan problemas en la síntesis química, sin embargo son pocos los reportes del uso de enzimas aisladas, en este caso la alcohol-deshidrogenasa (ADH), para llevar a cabo dichas oxidaciones, las razones de esta situación son las siguientes<sup>(13)</sup>:

- a) La oxidación de alcoholes es termodinámicamente desfavorable, lo cual provoca que el reciclaje del cofactor sea complicado
- b) La inhibición por formación de productos es un fenómeno común, ya que los aldehídos o cetonas formados tienen una mayor afinidad a la parte hidrofóbica del sitio activo de la enzima que el alcohol que es más polar.

- c) La oxidación enzimática usualmente tiene mejor resultado a valores de pH entre 8 y 9.
- d) La oxidación de un alcohol secundario implica la destrucción de un centro estereogénico.

La mayor dificultad en la resolución de alcoholes vía la oxidación enantioselectiva utilizando enzimas es la regeneración de los cofactores, todos los métodos biocatalíticos empleados en la transferencia asimétrica de hidrógeno basados en el uso de ADH, requieren de cofactores de nicotinamida,  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  como se muestra en el siguiente esquema 1.

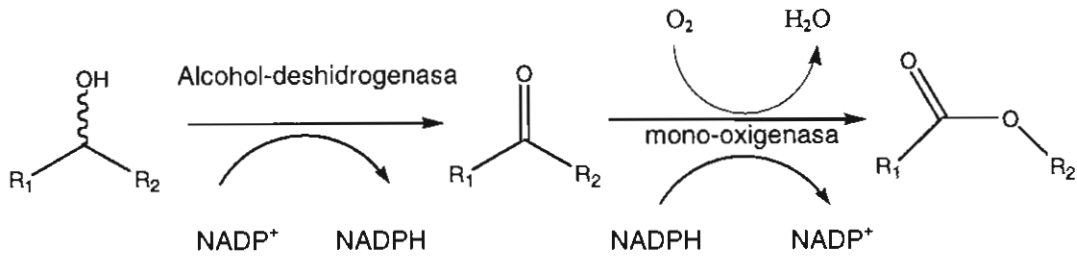
Esquema 1. Resolución de alcoholes



Una de las alternativas para la regeneración del cofactor, es el empleo de sistemas enzimáticos acoplados, como el sistema deshidrogenasa-oxigenasa descrito por Willetts AJ y colaboradores para la obtención de lactonas<sup>(28)</sup>, donde como primer paso se empleó una deshidrogenasa proveniente de *Thermoanaerobium brockii* o de *Pseudomonas sp* para llevar a cabo la oxidación enzimática del alcohol produciendo la cetona correspondiente, y en el segundo paso se empleó una mono-oxigenasa proveniente de *Acinetobacter sp* o de *Pseudomonas sp*, para generar la lactona y regenerar el cofactor reducido, el esquema 2 del proceso se muestra a continuación.

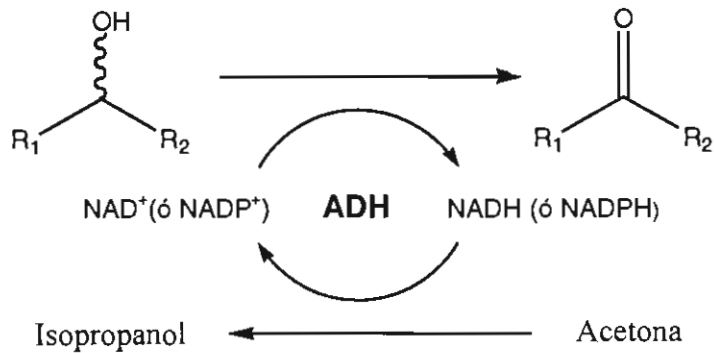


## Esquema 2. Sistemas enzimáticos acoplados



También se tiene como alternativa, para la regeneración del cofactor, la adición de un segundo sustrato (co-sustrato) susceptible de ser reducido, esquema 3, buscando las condiciones que brinden un máximo grado de reacción y una mínima inhibición de la actividad enzimática, sin embargo esta opción presenta dificultades debido a que el sistema se puede volver inestable a concentraciones elevadas de co-sustrato y se pueden presentar fenómenos de inhibición.

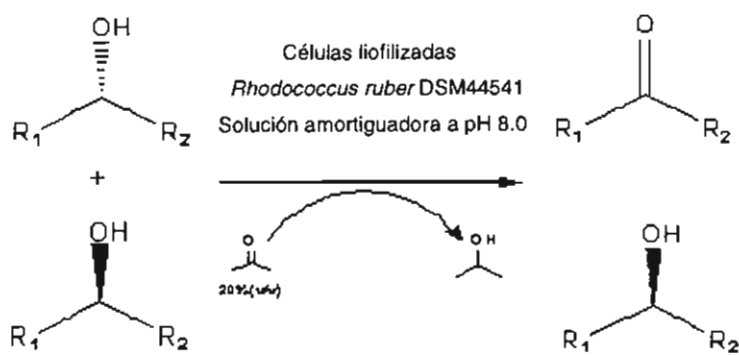
## Esquema 3. Regeneración de cofactores



En especial estos fenómenos se presentan cuando se emplean deshidrogenasas de alcoholes secundarios (*sec*-ADH), y como consecuencia su

empleo a gran escala esta restringido al uso de células en fermentación y están limitadas al uso de bajas concentraciones de co-sustrato, se ha reportado el uso de acetona hasta en un 20%(v/v) como co-sustrato en la oxidación de alcoholes secundarios, esquema 4, lográndose mantener la estabilidad del sistema, obteniéndose una conversión completa y una excelente estereoselectividad<sup>(29)</sup>.

Esquema 4. Oxidación de alcoholes con células liofilizadas



Se ha reportado el uso de los siguientes microorganismos para efectuar oxidaciones enantioselectivas de alcoholes secundarios *Corynebacterium equi*<sup>(30)</sup>, *Rhodococcus erythropolis*<sup>(31)</sup>, *Bacillus stearothermophilus*<sup>(32)</sup>, *Yarrowia lipolytica*<sup>(33)</sup> y *Nocardia corallina*<sup>(34)</sup>, dando como productos de biotransformación la cetona correspondiente y el alcohol enantioméricamente enriquecido.

## 2.15 Oxidación química de alcoholes.

Este tipo de reacción, es una de las más empleadas en la química orgánica, pero a su vez es una de las más complejas; tanto por el número de reactivos que se pueden utilizar, como por la gran variedad de mecanismos de reacción involucrados.

En el campo de la química orgánica industrial, la oxidación constituye una de las principales herramientas en la síntesis de compuestos y uno de los métodos con mayor potencial de contaminación<sup>(35)</sup>. Una de las reacciones más comunes de los alcoholes es su oxidación para dar compuestos carbonílicos, los alcoholes primarios dan aldehídos o ácidos carboxílicos, y los alcoholes secundarios cetonas, por lo general los alcoholes terciarios no reaccionan con la mayor parte de los agentes oxidantes.

La oxidación de un alcohol primario o secundario se puede llevar a cabo con reactivos que incluyen catalizadores organometálicos de titanio<sup>(36-39)</sup> o manganeso<sup>(40,41)</sup>,  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{CrO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ <sup>(42)</sup>, sales de  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  en  $\text{NaOCl}$ <sup>(43)</sup>, aire y  $\text{Pd}$ /carbón animal en solución acuosa alcalina<sup>(44)</sup>, aire sobre  $\text{Ag}_2\text{O}$  en medio alcalino<sup>(45)</sup>, aire sobre  $\text{CuO-Ag}_2\text{O}$ <sup>(46)</sup>,  $\text{H}_2\text{O}_2$  en medio alcalino<sup>(47)</sup> y piridina<sup>(48)</sup> entre otros.

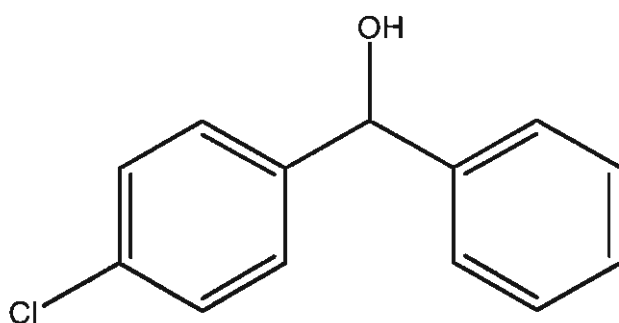
El uso de los agentes oxidantes, en un caso específico, depende de factores como costo, conveniencia, rendimiento de la reacción y sensibilidad del alcohol. Los alcoholes primarios se oxidan a aldehídos o ácidos carboxílicos, dependiendo de los reactivos seleccionados y de las condiciones utilizadas. Quizá el mejor método para preparar un aldehído a partir de un alcohol primario, a escala de laboratorio (en oposición a escala industrial), es el uso de clorocromato de piridinio ( $\text{PCC}$ ,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N-CrO}_3\text{Cl}$ ) en diclorometano como disolvente<sup>(49)</sup>.

La mayor parte de los otros agentes oxidantes como el  $\text{CrO}_3$  en ácido acuoso, oxidan alcoholes primarios a ácidos carboxílicos. El intermediario en esta reacción es un aldehído, pero usualmente no se puede aislar porque se oxida con demasiada rapidez.

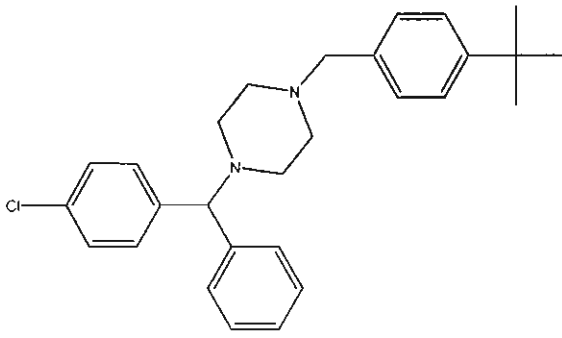
Para los alcoholes más sensibles, con frecuencia se utiliza el PCC debido a que la reacción es más suave y se efectúa a temperaturas más bajas<sup>(49)</sup>.

Quedando como reto por resolver la gran cantidad de sales que quedan como desecho de algunos de estos procesos. Por lo que los métodos de oxidación biocatalítica representan amplias ventajas al no generar estos desechos tóxicos.

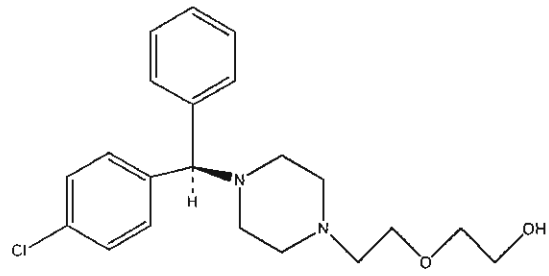
### 2.16 (±)-4-clorobencidrol.



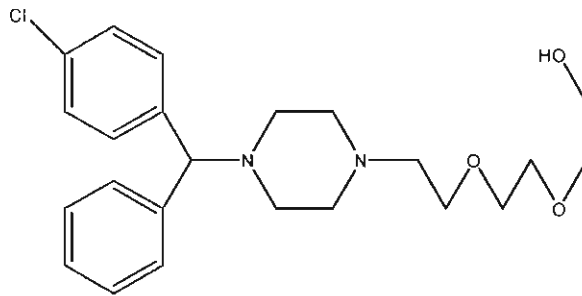
Los diaril carbinoles quirales son intermediarios muy útiles para la preparación de compuestos con actividad biológica<sup>(50)</sup> en este grupo de compuestos se encuentra el (±)-4-clorobencidrol, cuyo esqueleto hidrocarbonado está presente en la estructura de los siguientes principios activos: buclizina (antialérgico, antihistamínico), hidroxizina (tranquilizante), etodroxizina (tranquilizante, hipnótico) y clobenzotropin (antihistamínico)<sup>(51)</sup>, y recientemente se ha reportado que el (±)-4-clorobencidrol unido a fragmentos de pirrolidinas o piperidinas se obtienen compuestos que muestran actividad como bloqueadores de los canales de calcio e inhiben la proliferación de las líneas celulares cancerosas<sup>(52)</sup>.



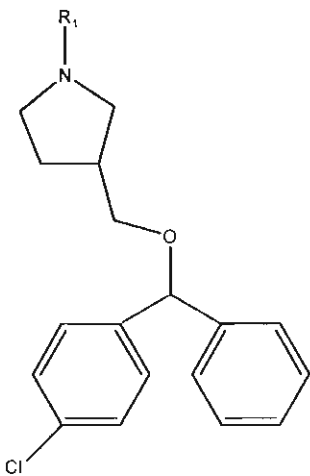
buclizina (antialérgico, antihistamínico)



hidroxizina (tranquilizante)

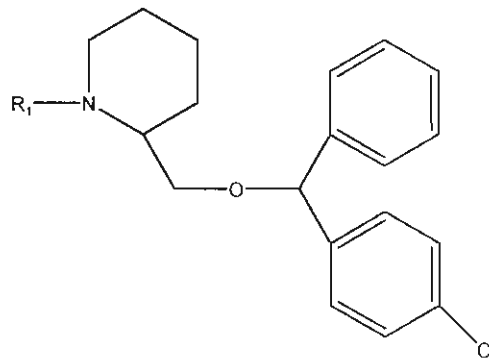


etodroxizina (tranquilizante, hipnótico)



Derivado de pirrolidina

$R_1 = 4\text{-MeOC}_6\text{H}_4, 4\text{-HOC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2,$   
 $4\text{-MeOC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2$



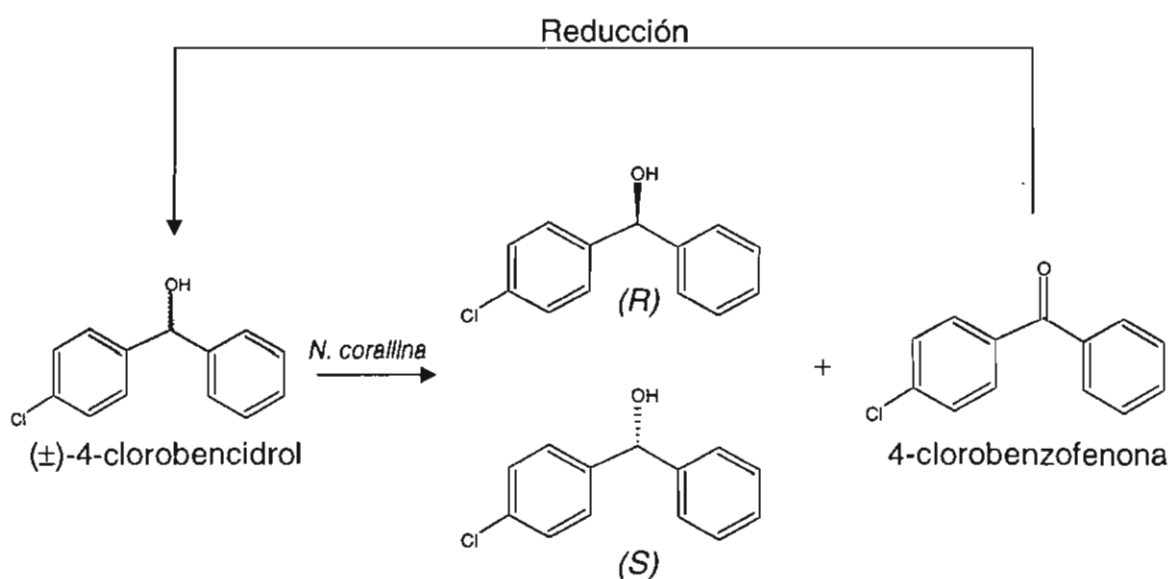
Derivado de piperidina

$R_1 = 4\text{-MeOC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2$

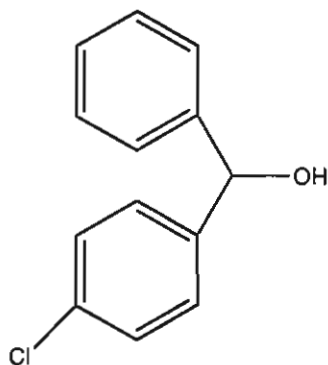
### 2.16.1 Proceso de biotransformación del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol, con *Nocardia corallina*.

El proceso de biotransformación del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol por *Nocardia corallina* comprende, la oxidación enantioselectiva del enantiómero (*S*) a la 4-clorobenzofenona y el consecuente enriquecimiento del enantiómero (*R*). A partir de la 4-clorobenzofenona se puede volver a obtener el ( $\pm$ )-4-clorobencidrol, mediante reducción.

Esquema 5. Proceso general de la biotransformación del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol con *Nocardia corallina*.



2.17 Propiedades fisicoquímicas del (±)-4-clorobencidrol, (R)-4-clorobencidrol, (S)-4-clorobencidrol y 4-clorobenzofenona.



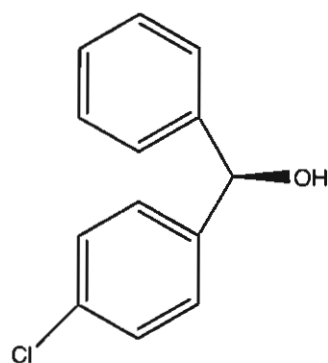
(±)-4-clorobencidrol

Fórmula condensada:  $C_{13}H_{11}ClO$

Peso molecular: 218.68

Punto de fusión: 58-60°C

Punto de ebullición. 352.2±27.0°C



(R)-4-clorobencidrol

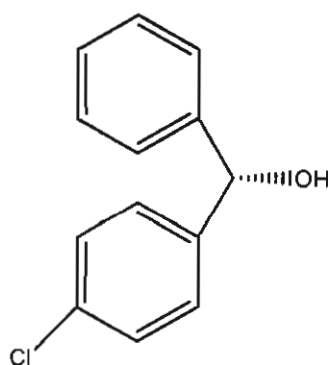
Fórmula condensada:  $C_{13}H_{11}ClO$

Peso molecular: 218.68

Punto de fusión: 58-60°C

Punto de ebullición. 352.2±27.0°C

Rotación específica  $[\alpha]_D = -14.7(c1.0, CHCl_3)^{(34)}$



(S)-4-clorobencidrol

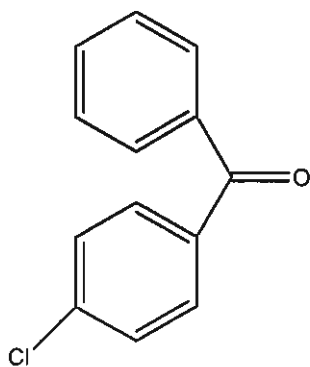
Fórmula condensada:  $C_{13}H_{11}ClO$

Peso molecular: 218.68

Punto de fusión: 58-60°C

Punto de ebullición. 352.2±27.0°C

Rotación específica  $[\alpha]_D = +14.7(c1.0, CHCl_3)^{(34)}$



Fórmula condensada:  $C_{13}H_9ClO$

Peso molecular: 216.67

Punto de fusión: 74-76°C

Punto de ebullición: 195-196°C

4-clorobenzofenona

## 2.18 Métodos de resolución y de análisis cuantitativo de enantiómeros.

Los métodos principales que existen actualmente para determinar la pureza enantiomérica se clasifican en dos grandes grupos, según requieran la separación previa de los enantiómeros o no.

**Grupo I:** Requieren la separación previa de los enantiómeros

En este grupo se encuentran las técnicas cromatográficas (gases o líquidos) con fase estacionaria quiral.

**Grupo II:** No requieren la separación previa de los enantiómeros

En este grupo encontramos a la polarimetría, el análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) de muestras que se han derivatizado con reactivos de desplazamiento o usando disolventes quirales.

También se puede derivatizar para formar diastereoisómeros y analizar por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y cromatografía de gases (CG) con columnas no quirales.

Para realizar una separación de enantiómeros o resolución es posible aplicar distintas técnicas, según el caso en concreto, como las que a continuación se mencionan <sup>(53)</sup>.



1.- Cristalización en conglomerados: cuando una mezcla racémica se cristaliza en forma de conglomerado, sus cristales presentan estructuras objeto-imagen y pueden separarse manualmente con la ayuda de un microscopio, esta técnica no es aplicable a gran escala.

2.- Transformación de una mezcla de enantiómeros en una de diastereoisómeros, posteriormente se pueden separar por:

### *Cristalización*

Si una mezcla racémica reacciona con una sustancia enantioméricamente pura (X), se convierte en una mezcla de diastereoisómeros, que poseen distintas propiedades físicas, eligiendo cuidadosamente (X), puede encontrarse un disolvente, o mezcla de disolventes, en el que ambos diastereoisómeros se disuelvan de forma muy diferente, lo que permitirá separarlos por recristalización para liberarlos después <sup>(53)</sup>.

### *Métodos cromatográficos*

La cromatografía se basa en la distribución de un compuesto entre dos fases, una móvil y otra estacionaria, un compuesto que logre interactuar de manera más estable con una fase estacionaria que otro, tardará más en eluir, y tendrá un tiempo de retención mayor. Para la separación de enantiómeros se emplean columnas quirales, en donde las interacciones entre la fase estacionaria quiral y los dos enantiómeros se comportan como diastereoisómero, por lo que ambos poseen una velocidad de elución distinta con determinados disolventes o mezcla de disolventes <sup>(53)</sup>.

### *Resonancia magnética nuclear (RMN).*

La RMN no distingue entre enantiómeros, pero sí entre diastereoisómeros, por lo que para determinar la pureza enantiomérica habrá que formar especies

diastereoisómeras entre los enantiómeros de la muestra a analizar y un auxiliar quiral enantioméricamente puro (AQ). Los AQ pueden dividirse en tres grupos: agentes quirales de derivación, reactivos lantánidos quirales de desplazamiento y agentes quirales de solvatación <sup>(53)</sup>.

#### *Agentes quirales de derivación*

Se requiere una reacción química previa entre el agente de derivación y la mezcla enantiomérica a analizar. Las reacciones más frecuentes son las de esterificación, acidificación, transesterificación o transamidificación.

#### *Reactivos lantánidos quirales de desplazamiento*

Son compuestos quirales formados por un lantánido hexacoordinado que tiene, como ligandos, derivados de alcanfor (generalmente  $\alpha$ -acil-derivados polifluorados). Son quelatos de europio (III), praseodimio (III) o iterbio (III), que forman complejos por equilibración (intercambio de ligando) con los enantiómeros de soluto de tipo alcohol, cetona, amina o éster, entre otros.

#### *Agentes quirales de solvatación*

Al añadir un agente quiral de solvatación a una disolución en un disolvente no polar, como cloroformo deuterado, de la mezcla de enantiómeros que se analiza, se pueden establecer interacciones a través de enlaces de hidrógeno, interacciones  $\pi$ - $\pi$  o de Van der Waals, para así formar especies diastereoisómeras, que en general presentan señales diferentes en RMN <sup>(53)</sup>.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante las décadas finales del siglo pasado tomó gran importancia la separación y obtención de compuestos enantioméricamente puros, debido a que algunos de ellos son empleados como intermediarios en la síntesis de compuestos biológicamente activos.

Esto ha traído consigo el desarrollo de nuevos métodos de obtención, separación e identificación de estos compuestos, como son la aplicación de nuevas tecnologías basadas en el empleo de la maquinaria enzimática microbiana y recientemente han sido explorados métodos no enzimáticos<sup>(54)</sup>.

Por ello se propone desarrollar este proyecto de biotransformación, utilizando microorganismos el cual es ambientalmente más amigable, con el fin de presentar una alternativa a los métodos tradicionalmente empleados, los cuales son generalmente fuente de contaminación ambiental, para la oxidación enantioselectiva del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol con *Nocardia corallina*.

## 4. HIPÓTESIS

La oxidación del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol con *Nocardia corallina* B-276 procederá de manera enantioselectiva

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General:

Hacer el estudio cinético de la resolución del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol y escalar el proceso de la oxidación enantioselectiva a nivel fermentador.

### 5.2 Objetivos Específicos:

- Realizar el escalamiento de la oxidación enantioselectiva del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol con *Nocardia corallina* a nivel fermentador de 3 litros.
- Realizar el estudio cinético del proceso de oxidación enantioselectiva del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol con células suspendidas de *Nocardia corallina* en solución amortiguadora de fosfatos.
- Desarrollar el método analítico para el seguimiento de la biotransformación.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Descripción del equipo.

- 1.- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) Agilent 1100 con detector de UV/visible de arreglo de diodos.
- 2.- Cromatógrafo de gases (CG) HP 6890 series.
- 3.- Espectrofotómetro de infrarrojo (IR) Perkin-Elmer Paragon 1600 FT
- 4.- Resonancia magnética nuclear (RNM) Varian 400 MHz
- 5.- Espectrofotómetro Genesys 20 (325 – 1100 nm).
- 6.- Agitador orbital REVCO
- 7.- Bioreactor autoclavable de 3 litros Applikon, equipado con una mantilla eléctrica para regular la temperatura, termómetro de Pt 100, sensor de pH Applisens Z001023510 (pH 0-12/0-135°C), sensor de oxígeno disuelto Applisens Z010019011, difusor de aire, rotámetro, agitador con sistema de propelas con velocidad variable, toma de muestras, condensador y registrador automatizado de variables, con:
  - a) Control de agitación P100 ADI 1032 Applikon de velocidad variable
  - b) Consola de flujo Applikon
  - c) Consola ADI 1030 Bio Controller Applikon (pH, temperatura, O<sub>2</sub>)
  - d) Software Bio Xpert Data acquisition & control program versión 1.1 x

## **6.2 Desarrollo del método analítico.**

### **6.2.1 Reactivos.**

(±)-4-clorobencidrol 98 % (Sigma-Aldrich), 4-clorobenzofenona 99 % (Sigma-Aldrich), isopropanol grado CLAR, hexano grado CLAR.

### **6.2.2 Preparación de muestras para el método analítico (CLAR y CG).**

#### **- Solución de referencia 1**

Se pesaron 5 mg de (±)-4-clorobencidrol, se disolvieron en 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se filtraron a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y el filtrado se colectó en un vial.

#### **- Solución de referencia 2**

Se pesaron 5 mg de 4-clorobenzofenona, se disolvieron en 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se filtraron a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y el filtrado se colectó en un vial.

#### **- Mezcla de referencia.**

Se pesaron 2 mg de (±)-4-clorobencidrol y 2 mg de 4-clorobenzofenona, ambos se disolvieron en 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se filtró a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y el filtrado se colectó en un vial.

### 6.2.3 Determinación del porcentaje de relación enantiomérica.

La separación de los enantiómeros *R* y *S* del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) equipado con una columna CHIRACEL OB-H (250 X 4.6 mm L X ID)

Tabla 2. Condiciones cromatográficas experimentales

No. Corrida	Velocidad de flujo mLmin <sup>-1</sup>	Temp. °C	Fase Móvil	$\lambda$ de detección nm
1	0.6	24	hexano/isopropanol 90:10	230,254,260, 270, 280
2	0.8	24	hexano/isopropanol 90:10	230,254,260, 270, 280
3	1.0	24	hexano/isopropanol 90:10	230,254,260, 270, 280
4*	0.8	20	hexano/isopropanol 90:10	230
5*	0.8	30	hexano/isopropanol 90:10	230

\*Se seleccionó la velocidad de flujo y la  $\lambda$  según los resultados obtenidos en las corridas 1, 2 y 3

### 6.2.4 Determinación del porcentaje de conversión.

El porcentaje de conversión se determinó por cromatografía de gases (CG), con una columna HP-5 (5% HP ME Siloxano, 30000 X 0.25 mm L X ID)

Condiciones cromatográficas experimentales:

flujo=0.8 mL/min, T inyector= 250°C, T detector=250°C, T del horno=180°C, gas acarreador N<sub>2</sub>.

### 6.3 Condiciones de producción de biomasa.

Composición del medio en las placas de agar<sup>(55)</sup>.

Extracto de levadura 3g/L, peptona 5g/L, agar 15g/L

Adaptación y crecimiento de *Nocardia corallina* B-276 (ATCC 31338)

La bacteria se adaptó mediante siembra en placas de agar y su posterior incubación a 28-32°C durante 72-96 horas.

Preparación del medio de cultivo.

El medio de cultivo se preparó con la siguiente composición

0.05 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/L; 1.74 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/L; 2.0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L; 1.0 g extracto de levadura/L, 1.5 g MgSO<sub>4</sub>/L y 2.0 g glucosa/L.

Se pesó la cantidad necesaria para preparar el medio, se ajustó el pH a 9.0 con KOH al 50% recién preparada, se filtró y se esterilizó a 121°C durante 20 minutos, quedando un pH 8.0-8.5.



### 6.3.1 Curva patrón peso seco vs. densidad óptica (DO).

Para poder medir la masa celular/biomasa durante las diferentes fases del proceso se construyó una curva patrón peso seco vs. DO de la siguiente manera:

1.- Se colocaron membranas de 0.15  $\mu\text{m}$  en la estufa a 60°C de 24-30 horas hasta tener peso constante.

2.- Se adaptó la *Nocardia corallina* mediante siembra en placas de agar y su posterior incubación a 28-32°C durante 72-96 horas.

3.- Las colonias de *Nocardia corallina*, crecidas en las placas de agar se transfirieron, a dos matraces Erlenmeyer de 500 mL con deflectores, conteniendo 200 mL de medio de cultivo en cada uno, previamente esterilizado, estos se incubaron a 28-32°C y se agitaron a 170 rpm en un agitador orbital.

4.- Se tomaron muestras por duplicado de 5 mL cada hora, durante 8hrs se leyó la DO en un espectrofotómetro a 660 nm, se filtraron y se secaron durante 30 horas a 60°C en la estufa.

5.- Se pesaron y se construyó el gráfico peso seco (g/L) vs. DO.

### 6.3.2 Determinación experimental de la transferencia de oxígeno.

Técnica dinámica (régimen no estacionario).

Se empleó un fermentador Applikon de 3 L con 1800 mL de medio de cultivo estéril, 121°C/30 min. pH = 8.0 - 8.5, se ajustó la temperatura del sistema a 28-32°C, y la aireación a 0.9vvm (volumen volátil por minuto), se probaron 4 velocidades de agitación: 126, 226, 250 y 300 rpm, en cada caso el sistema se dejó durante 12hrs aproximadamente bajo estas condiciones, con el fin de alcanzar el grado máximo de saturación de O<sub>2</sub>, se calibró este valor como el 100% de saturación, el valor de 0% se calibró burbujeando N<sub>2</sub> en el medio hasta estabilización.

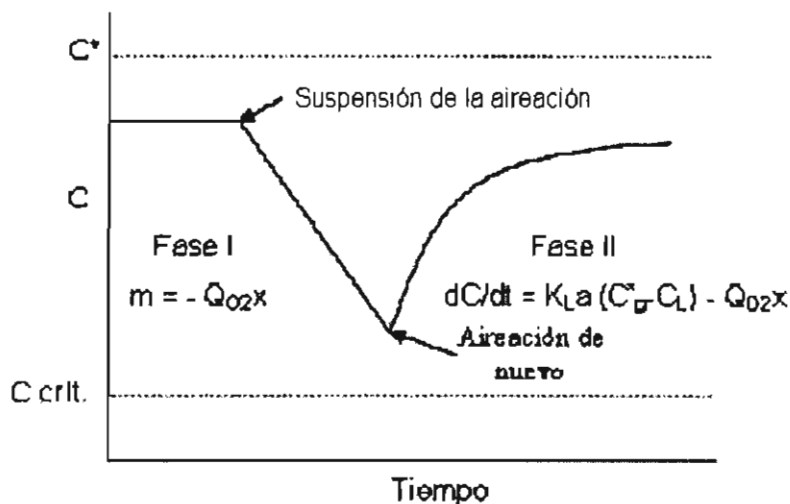
La secuencia de operación fue la siguiente:

Teniendo calibrado el electrodo de oxígeno y las condiciones de operación estables (pH, temperatura, aireación y velocidad de agitación), se adicionó trietilcitrato como antiespumante (0.15 mL), y 400 mL de inóculo con 43-45 horas de crecimiento, a los 1800 mL de medio, al cual previamente se le midió la absorbancia para poder conocer la concentración de biomasa presente, después de la adición se suspendió el flujo de aire.

Los datos de la disminución en la concentración de oxígeno disuelto hasta llegar a valores cercanos al 40% (fase I), se registraron cada minuto con el programa Bio Xpert, al llegar al 40% de oxígeno se reestableció el flujo de aire y se registró el aumento cada minuto, hasta el momento que llegara a un punto máximo y se mantuviera estable (fase II).

Con los valores registrados de la fase I se determinó el  $Q_{O_2X}$  y con los valores de la fase II se determinó el  $K_La$  puntual. Para determinar el  $K_La$  del fermentador se siguió la metodología antes descrita, pero sin adicionar el inóculo ver gráfico 1.

Gráfico 1. Técnica dinámica (régimen no estacionario)



#### 6.4 Estudio cinético del proceso de biotransformación con células en reposo.

##### Preparación del inóculo.

El inóculo se preparó por transferencia de las colonias de *Nocardia corallina*, contenidas en las placas de agar, a dos matraces Erlenmeyer de 500 mL con deflectores, conteniendo 200 mL de medio de cultivo en cada uno, previamente esterilizado, estos se incubaron a 28-32°C y se agitaron a 170 rpm por 43-45 horas en un agitador orbital.

El contenido de estos matraces se trasvasó a un fermentador Applikon de 3 L con 1800 mL del mismo medio de cultivo estéril (pH a 8.0-8.5), se controló la temperatura del sistema a 28-32°C, la agitación a 226 rpm y la aireación a 0.9vvm.

##### Crecimiento celular.

El crecimiento celular en el fermentador se determinó cada hora midiendo la absorbancia de una muestra en un espectrofotómetro a 660 nm, hasta finalizar la fase de crecimiento exponencial.

##### Obtención de biomasa.

Las células se separaron del medio del cultivo por centrifugación a 4500 rpm durante 15 minutos, el medio se decantó y las células se lavaron dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos pH 7, centrifugando en cada ocasión bajo las mismas condiciones.

## Suspensión y adaptación de células.

Las células húmedas se pesaron y se suspendieron en 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos, se adaptaron durante 30 minutos a 28-30°C y 170 rpm, en un agitador orbital.

## Adición del (±)-4-clorobencidrol.

Con los resultados reportados de Pérez y colaboradores<sup>(34)</sup>, a las 27hrs de biotransformación del (±)-4-clorobencidrol en medio líquido (250mL), con un porcentaje de conversión del 53% de 4-clorobenzofenona y 47% del (S)-4-clorobencidrol que no reaccionó y con un % de exceso enantiomérico >99%, se hizo el estudio de la relación de sustrato:células p/p contra tiempo, para posteriormente hacer el estudio cinético del (±)-4-clorobencidrol con células en reposo de *Nocardia corallina*.

El proceso de biotransformación se realizó conforme a las condiciones mostradas en la Tabla 3.

El sustrato se disuelve previamente en el porcentaje de *N,N*-dimetilformamida seleccionado, se adiciona a las suspensión de células a 28-30°C y 170 rpm.

Tabla 3. Condiciones experimentales de la biotransformación del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol con células en reposo de *Nocardia corallina*.

Lote	Relación sustrato/células	% <i>N,N</i> -dimetilformamida	Tiempo de muestreo hrs
1	1:100	0.6	24
2	1:100	0.9	24
3	1:100	1.8	24
4	1:100	2.7	24
5	1:100	3.6	24
6	1:100	4.5	24
7*	1:20	0.6	36,48,60,72
8*	1:50	0.6	24,48,72
9*	1:100	0.6	36,48,60

\* El porcentaje de *N,N*-dimetilformamida se seleccionó según las corridas 1-6

#### Tratamiento de las muestras.

Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 4500 rpm, el sobrenadante obtenido se filtró sobre celita y se extrajo con (3x10 mL) de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente en el rotavapor, el residuo obtenido se suspendió en isopropanol, para determinar la relación enantiomérica por CLAR y el porcentaje de conversión por CG.

#### 6.4.1 Procedimiento General para la Biotransformación del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol con Células en Reposo.

Las células de *Nocardia corallina* crecidas en placas de agar por 72-96hrs (ver punto 6.3), se inoculan en dos matraces Erlenmeyer de 500 mL con reflectores conteniendo 200 mL del medio de cultivo, cada uno (punto 6.3), se incubaron a 28-32°C y 170 rpm por 43-45hrs, en condiciones estériles.

Se prepararon 1800 mL de medio de cultivo estéril (punto 6.3), para el fermentador Applikon de 3L con un pH = 8.0-8.5, a 28-32°C, 226 rpm y la aireación a 0.9 vvm, manteniéndolo durante 12hrs bajo estas condiciones, para la posterior adición de los 400 mL del inóculo anterior. El crecimiento celular en el fermentador se determinó cada hora midiendo la absorbancia hasta finalizar la fase de crecimiento exponencial, alcanzándose a las 6 horas, la cantidad de células se calculó conforme a la curva patrón obtenida en el punto 7.2.

Las células se separaron del medio del cultivo por centrifugación a 4500 rpm durante 15 minutos, el medio se decantó y las células se lavaron dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos pH 7, centrifugando en cada ocasión bajo las mismas condiciones. La cantidad de biomasa se pesó y se trasvasó a un matraz Erlenmeyer de 125 mL con reflectores con 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7, durante 30 minutos a 28-30°C y 170 rpm, en un agitador orbital. Se adicionó el ( $\pm$ )-4-clorobencidrol previamente disuelto en 0.6% DMF en una relación sustrato/células p/p 1:100, tomándose muestras desde el tiempo cero hasta 38 horas. Se hizo un blanco con células de *Nocardia corallina* en las mismas condiciones a las 38 horas. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 4500 rpm, el sobrenadante obtenido se filtró sobre celita y se extrajo con (3x10 mL) de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente en el rotavapor, el residuo obtenido se suspendió en isopropanol, para determinar la relación enantiomérica por CLAR y el porcentaje de conversión por CG.

### **6.5 Proceso de biotransformación en fermentador de 3 litros.**

La adaptación, crecimiento, preparación del inóculo y crecimiento celular se realizaron con el mismo procedimiento para el estudio cinético del proceso de biotransformación con células en reposo, punto 6.4.

Biotransformación del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol.

El sustrato se adicionó en una relación 1:100 sustrato/células p/p, 0.6 % de DMF y 100 mL de *n*-octano<sup>(34)</sup>, la cantidad de células se calculó conforme a la curva patrón obtenida en el punto **7.2**.

Seguimiento del proceso de biotransformación.

Se tomaron muestras de 10 mL, a las 0, 20, 22 y 24 horas después de haber adicionado el sustrato.

Tratamiento de las muestras.

Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 4500 rpm, el sobrenadante obtenido se filtró sobre celita, se extrajo con (3x250 mL) de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente en el rotavapor, el residuo obtenido se suspendió en isopropanol, para determinar la relación enantiomérica por CLAR y el porcentaje de conversión por CG.

#### **6.5.1 Procedimiento General para la Biotransformación del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol en el fermentador de 3 L.**

Las células de *Nocardia corallina* crecidas en placas de agar por 72-96hrs (punto **6.3**), se inoculan en dos matraces Erlenmeyer de 500 mL con reflectores conteniendo 200 mL del medio de cultivo, cada uno (punto **6.3**), se incubaron a 28-32°C y 170 rpm por 43-45hrs, en condiciones estériles.

Se prepararon 1800 mL de medio de cultivo estéril (punto **6.3**), para el fermentador Applikon de 3L con un pH = 8.0-8.5, a 28-32°C, 226 rpm y la aireación a 0.9 vvm, manteniéndolo durante 12hrs bajo estas condiciones, para la posterior adición de los 400 mL del inóculo anterior. El crecimiento celular en el fermentador se determinó cada hora midiendo la absorbancia hasta finalizar la

fase de crecimiento exponencial, alcanzándose a las 6 horas, la cantidad de células se calculó conforme a la curva patrón obtenida en el punto **7.2**.

Se adicionó el ( $\pm$ )-4-clorobencidrol previamente disuelto en 0.6% DMF en una relación sustrato/células p/p 1:100 y 100 mL de *n*-octano, tomándose muestras desde el tiempo cero hasta 48 horas. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 4500 rpm, el sobrenadante obtenido se filtró sobre celita y se extrajo con (3x250 mL) de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente en el rotavapor, el residuo obtenido se suspendió en isopropanol, para determinar la relación enantiomérica por CLAR y el porcentaje de conversión por CG.



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 7.1 Método analítico.

El proceso de biotransformación del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol por *Nocardia corallina* comprende, la oxidación enantioselectiva del enantiómero (*S*) a la 4-clorobenzofenona y el consecuente enriquecimiento del enantiómero (*R*), por lo tanto fue necesario determinar la relación enantiomérica *R/S* empleando CLAR del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol (Aldrich). Se determinó el tiempo de retención ( $t_R$ ) de las soluciones de referencia (1, 2) y de la mezcla de referencia según el punto 6.2.2, con el fin de verificar que no tuvieran algún contaminante que pudiera interferir en las determinaciones durante la biotransformación (pureza del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol 98% y de la 4-clorobenzofenona 99%),  $t_R(R)$ -4-clorobencidrol 17.3 min,  $t_R(S)$ -4-clorobencidrol 25.5 min<sup>(56)</sup> y que las condiciones experimentales permitieran la separación de los compuestos al estar formando una mezcla. se realizaron diferentes corridas para evaluar la influencia de la velocidad de flujo (0.6, 0.8 y 1.0 mLmin<sup>-1</sup>) a diferentes  $\lambda$  (230, 254, 260, 270 y 280 nm), lográndose la separación de las señales.

En la tabla 4 se muestran los tiempos de retención para cada solución de referencia y de la mezcla, la  $\lambda$  de 230 nm fue en la cual el ( $\pm$ )-4-clorobencidrol presentó una mayor resolución de los enantiómeros, y de la 4-clorobenzofenona, los valores de las áreas y la relación enantiomérica se muestran en la tabla 5.

Tabla 4. Tiempos de retención a diferentes velocidades de flujo,  $\lambda = 230$  nm, hexano/isopropanol 90:10, T 24°C

Muestra		Tiempo de retención (min)		
		0.6 mL/min	0.8 mL/min	1.0 mL/min
Sol. Ref. 1	E1	25.437	18.633	15.416
	E2	36.038	27.941	22.254
Sol. Ref. 2	Q	20.565	14.983	12.352
Mezcla de referencia	E1	25.216	18.358	15.463
	E2	37.096	26.832	22.828
	Q	21.336	14.911	12.677

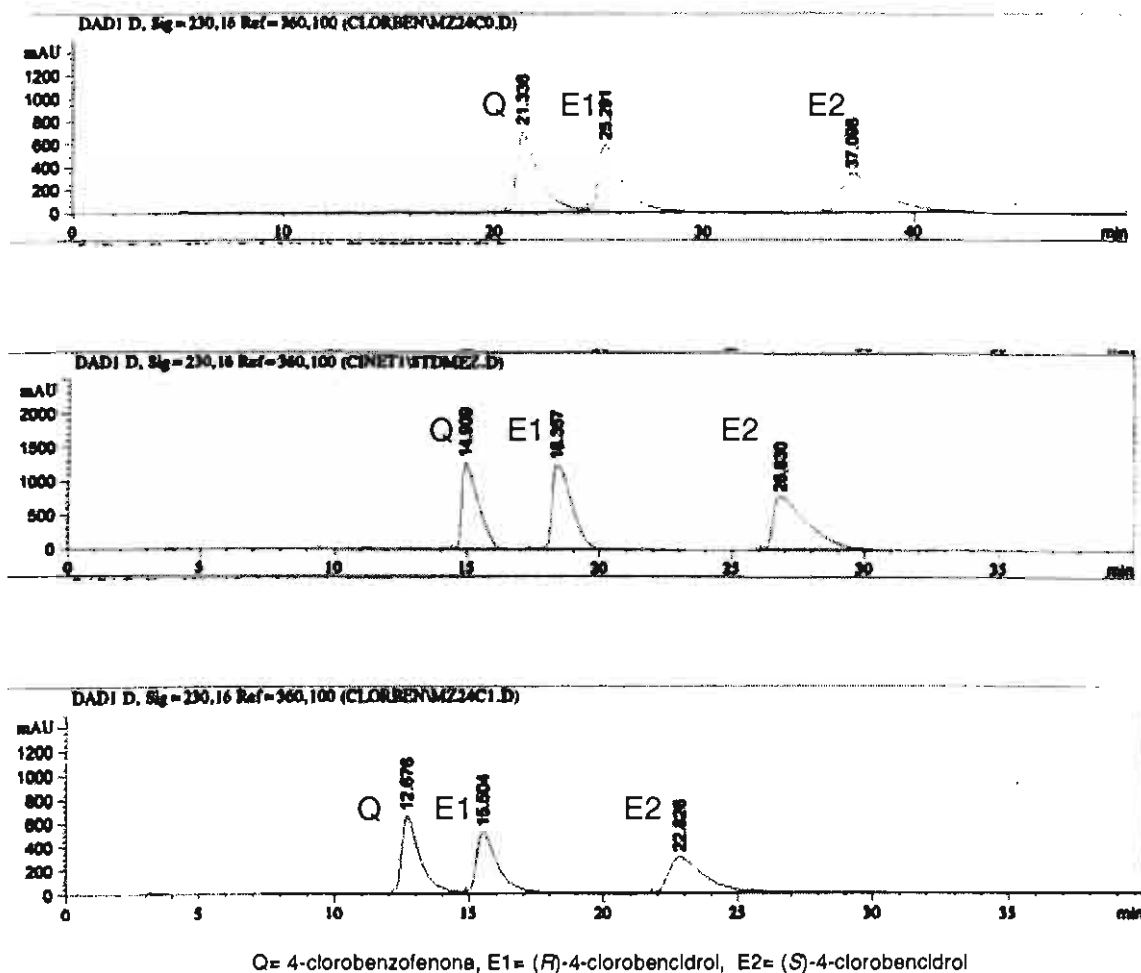
E1= (R)-4-clorobencidrol E2= (S)-4-clorobencidrol Q= 4-clorobenzofenona

Tabla 5. Áreas y relación de los enantiómeros (*R/S*) del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol a diferentes velocidades de flujo,  $\lambda = 230$  nm. hexano/isopropanol 90:10, T 24°C

Velocidad de flujo (mLmin <sup>-1</sup> )	Área		Porcentaje de relación enantiomérica	
	Enantiómero <i>R</i>	Enantiómero <i>S</i>	Enantiómero <i>R</i>	Enantiómero <i>S</i>
0.6	4.72311e4	4.57119e4	50.81	49.19
0.8	6.92641e4	7.00850e4	49.70	50.30
1.0	2.82276e4	2.74862e4	50.66	49.34

Con flujos de 0.6 mLmin<sup>-1</sup> y 1.0 mLmin<sup>-1</sup>, en los cromatogramas se observa que las señales correspondientes a la 4-clorobenzofenona y al (*R*)-4-clorobencidrol se empiezan a superponer, lo cual implicaría error al determinar la relación enantiomérica, figura 2.

Figura 2. Cromatogramas de la mezcla de referencia, T 24°C,  $\lambda = 230 \text{ nm}$ ,  
 velocidades de flujo de arriba hacia abajo 0.6, 0.8 y 1.0 mLmin<sup>-1</sup>  
 hexano/isopropanol 90:10



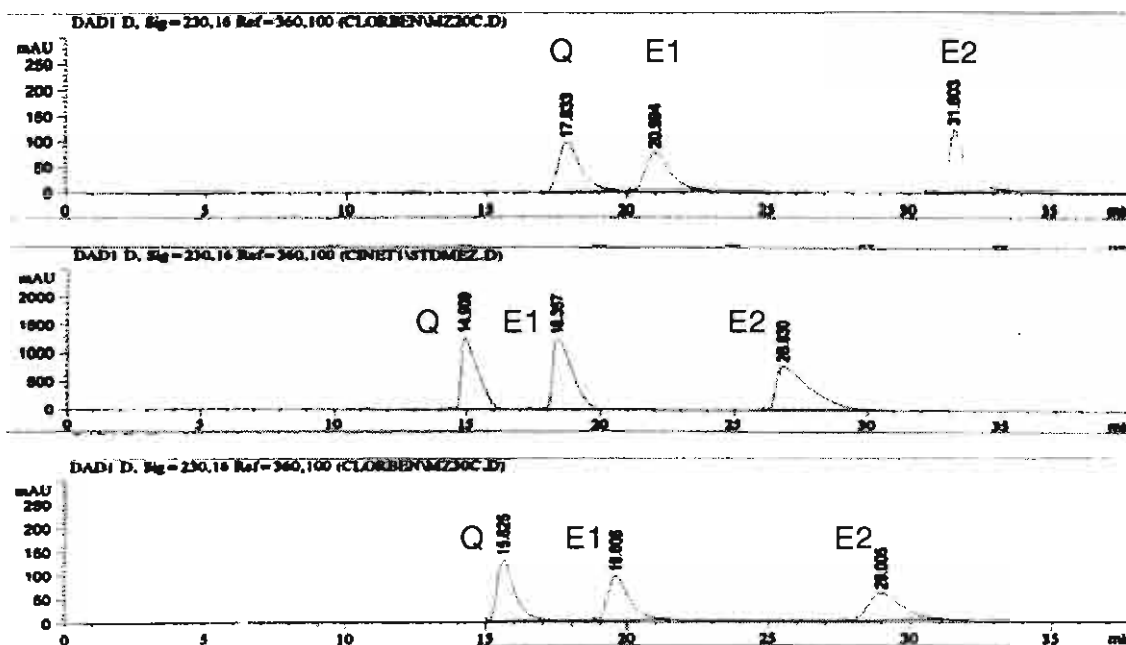
A partir de estos resultados se seleccionó el flujo de 0.8 mLmin<sup>-1</sup> y la  $\lambda = 230 \text{ nm}$  para las siguientes corridas; tomando en cuenta las especificaciones de la columna empleada (CHIRALCEL OB-H), que indican como rango de temperatura de operación de 0-40°C, se decidió probar temperaturas de 20°C, 24°C y 30°C, los tiempos de retención obtenidos se muestran en la tabla 6 y los cromatogramas en la figura 3.

Tabla 6. Tiempos de retención a diferentes temperaturas, hexano/isopropanol 90:10, velocidad de flujo 0.8 mLmin<sup>-1</sup>

Muestra		Tiempo de retención (min)		
		20°C	24°C	30°C
Sol. Ref. 1	E1	20.196	18.633	18.990
	E2	29.747	27.941	28.096
Sol. Ref. 2	Q	16.186	14.983	15.966
	E1	20.907	18.358	19.596
Mezcla de referencia	E2	31.584	26.832	29.001
	Q	17.833	14.911	15.625

E1= (*R*)-4-clorobencidrol E2= (*S*)-4-clorobencidrol Q= 4-clorobenzofenona

Figura 3. Cromatogramas de la mezcla de referencia, velocidad de flujo 0.8 mLmin<sup>-1</sup>, λ = 230 nm. Temperaturas de arriba hacia abajo 20°C, 24°C y 30°C hexano/isopropanol 90:10



Q= 4-clorobenzofenona, E1= (*R*)-4-clorobencidrol, E2= (*S*)-4-clorobencidrol

Con las tres temperaturas probadas se lograron separar los enantiómeros y la 4-clorobenzofenona.

Se analizó la proporción de los enantiómeros (*R/S*) del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol a las diferentes temperaturas y se observó que la relación enantiomérica fue más cercana a 50/50 cuando se empleó la temperatura de 24°C (tabla 7).

Tabla 7. Áreas y relación de los enantiómeros (*R/S*) del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol, velocidad de flujo = 0.8 mLmin<sup>-1</sup>,  $\lambda$  =230 nm, T= 20°C, 24°C y 30°C, hexano/isopropanol 90:10

Temperatura °C	Área		Porcentaje de relación enantiomérica	
	Enantiómero <i>R</i>	Enantiómero <i>S</i>	Enantiómero <i>R</i>	Enantiómero <i>S</i>
20	4455.16406	5275.52197	45.80	54.2
24	6.92641e4	7.00850e4	49.70	50.30
30	4788.32568	4540.45947	51.33	48.67

Con base en lo anterior se seleccionaron como condiciones óptimas para determinar la relación enantiomérica: flujo 0.8 mLmin<sup>-1</sup>, T=24°C y  $\lambda$ =230 nm y como eluyente una mezcla de hexano:isopropanol 90:10.

Para cuantificar el porcentaje de conversión se empleó CG, se probaron las siguientes condiciones de trabajo: flujo=0.8 mLmin<sup>-1</sup>, T<sub>inyector</sub>=250°C, T<sub>detector</sub>=250°C, T<sub>horno</sub>=180°C y N<sub>2</sub> como gas acarreador.

Se corrieron las soluciones de referencia 1 y 2, obteniéndose señales bien definidas y con los siguientes tiempos de retención (*t<sub>R</sub>*), para la 4-clorobenzofenona *t<sub>R</sub>* =4.104 y para el ( $\pm$ )-4-clorobencidrol *t<sub>R</sub>* =4.614, como se aprecia en las figuras 4 y 5.

Figura 4. Cromatograma del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol, flujo=0.8 mLmin<sup>-1</sup>,  
T<sub>inyector</sub>=250°C, T<sub>detector</sub>=250°C, T<sub>homo</sub>=180°C y N<sub>2</sub> como gas acarreador.

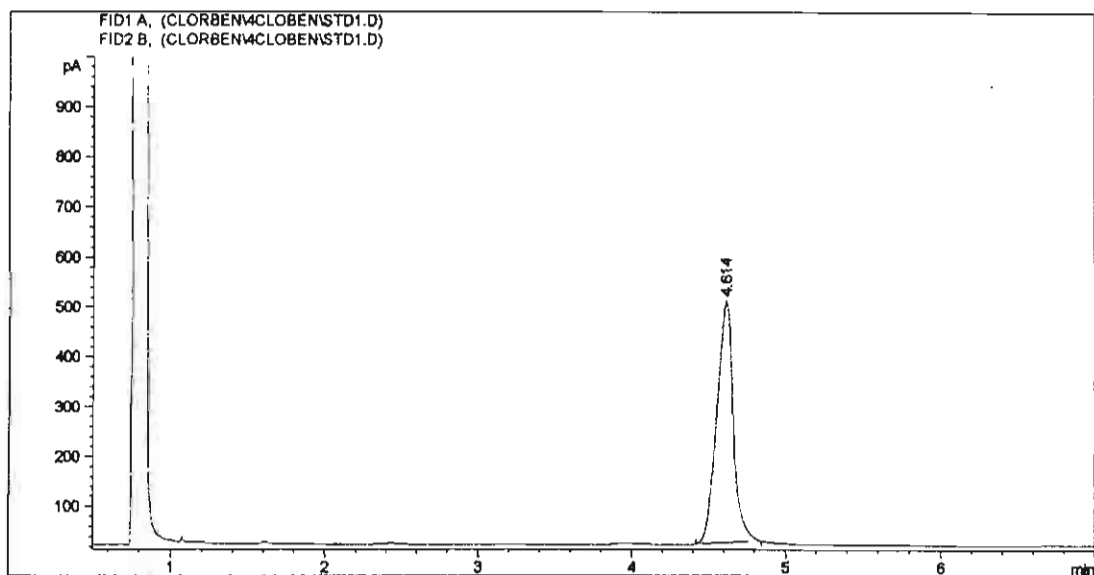
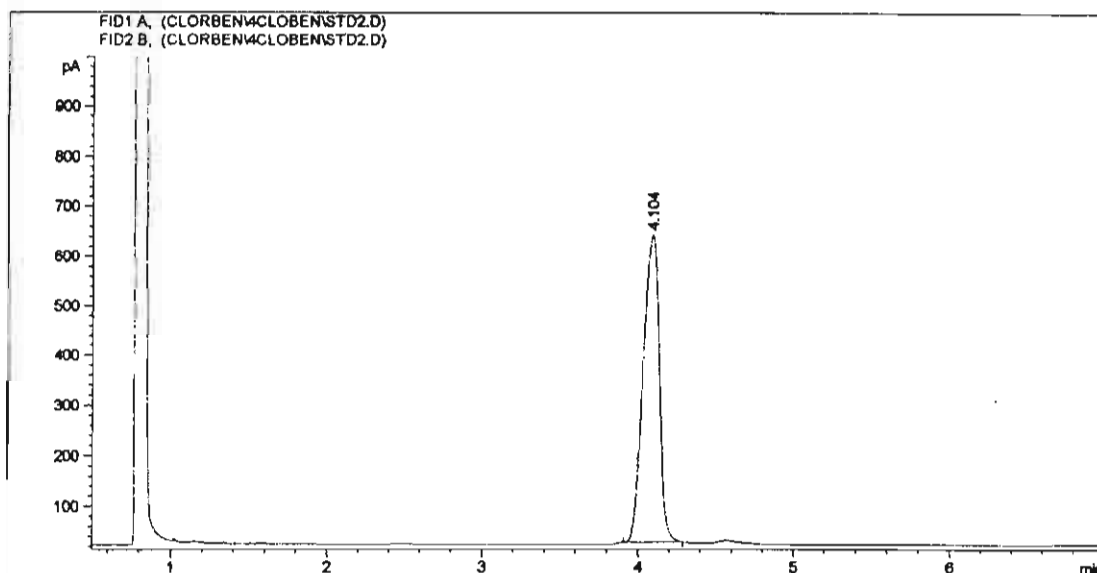


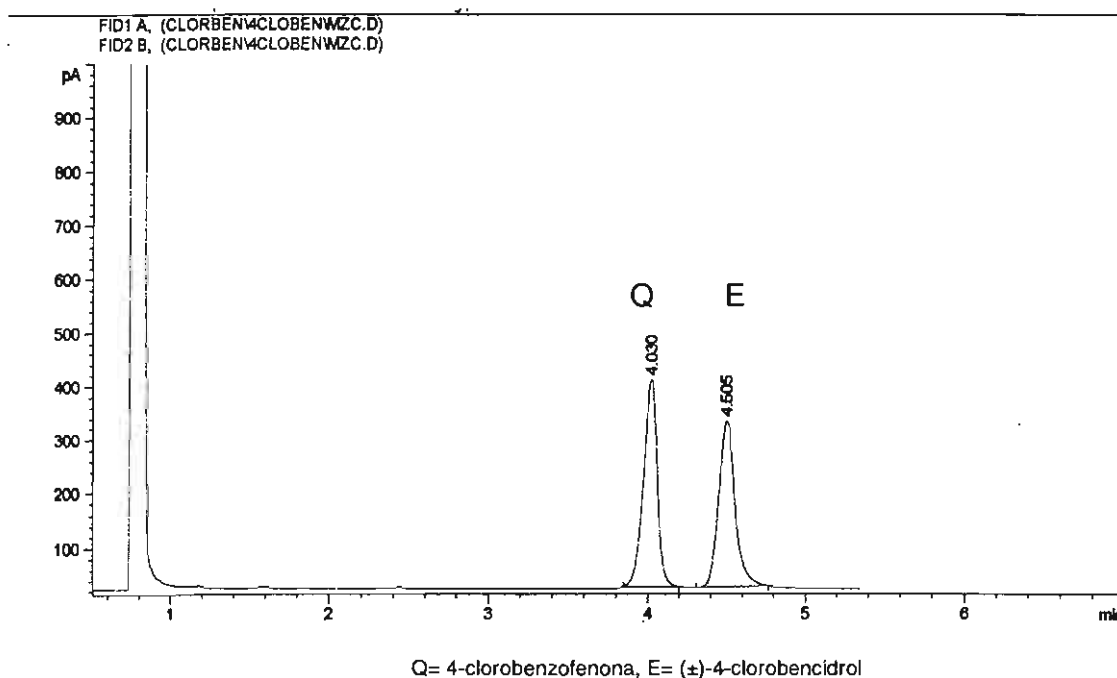
Figura 5. Cromatograma de la 4-clorobenzofenona, flujo=0.8 mLmin<sup>-1</sup>,  
T<sub>inyector</sub>=250°C, T<sub>detector</sub>=250°C, T<sub>homo</sub>=180°C y N<sub>2</sub> como gas acarreador.



Posteriormente se corrió la muestra correspondiente a la mezcla de referencia, ya que las muestras que se obtendrían durante el proceso de biotransformación, serían una mezcla, por lo tanto, fue necesario el verificar que bajo las condiciones de trabajo se obtuvieran señales separadas y bien definidas, que permitieran el análisis del porcentaje de conversión.

El resultado obtenido se muestra en la figura 6, donde aparecen las señales correspondientes a la 4-clorobenzofenona y al ( $\pm$ )-4-clorobencidrol, por orden de aparición, con tiempos de retención de 4.030 min y 4.505 min respectivamente.

Figura 6. Cromatograma de la mezcla de referencia, flujo=0.8 mLmin<sup>-1</sup>, T<sub>inyector</sub>=250°C, T<sub>detector</sub>=250°C, T<sub>horno</sub>=180°C y N<sub>2</sub> como gas acarreador.



En este caso la muestra fue preparada pesando cantidades iguales de las soluciones de referencia 1 y 2, esperándose que el porcentaje calculado fuese del 50% para cada uno de ellos, experimentalmente la relación obtenida fue de 51% para la cetona y 49% para el alcohol, recordemos que un factor que puede influir en la obtención de estos resultados es la pureza de los compuestos empleados,

se concluyó que las condiciones empleadas son las adecuadas para el análisis del porcentaje de conversión.

## 7.2 Condiciones de producción de biomasa.

Los microorganismos para su crecimiento requieren de condiciones óptimas de temperatura, pH, oxígeno y una adecuada composición del medio de cultivo, el contar con estas condiciones se vera reflejado en el aumento de la cantidad de células (biomasa) en menor tiempo.

Por lo que es importante el conocer la cinética de crecimiento celular, en ciertas condiciones de pH, T y composición del medio de cultivo para poder predecir cómo va a evolucionar el cultivo. Primero se elaboró una curva patrón peso seco vs DO para determinar la concentración celular ( $X$ ) en los tiempos que se tomarían las muestras y poder monitorear la curva de crecimiento, los valores obtenidos se muestran en el gráfico 2 y tabla 8.

Gráfico 2. Curva patrón peso seco vs DO.

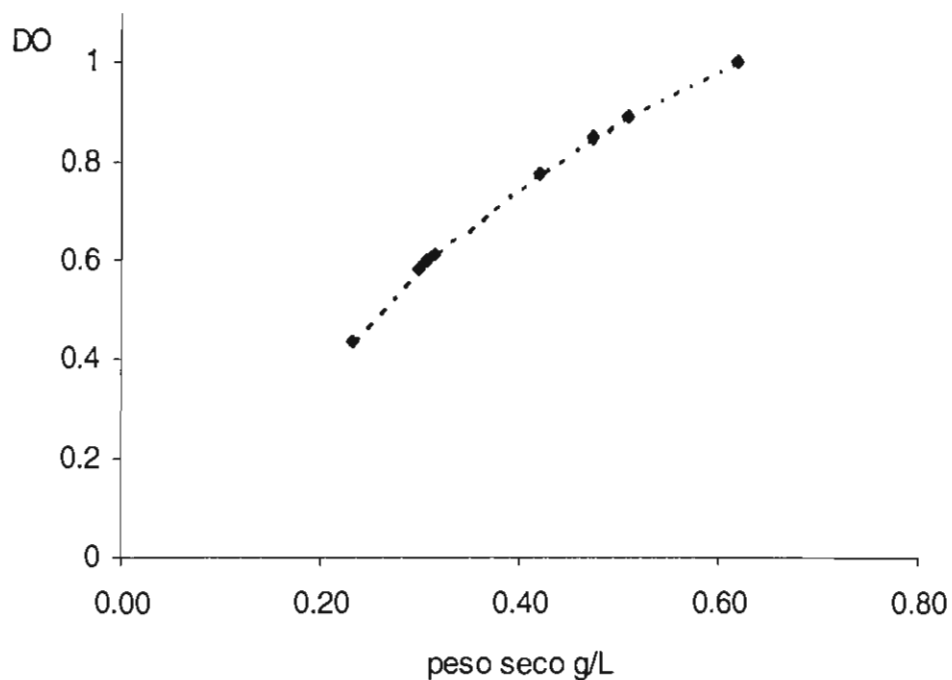




Tabla 8. Peso seco Vs DO

peso seco g/L	DO
0.62	1
0.51	0,889
0.48	0,847
0.42	0,777
0.32	0,612
0.31	0,600
0.30	0,582
0.23	0,436

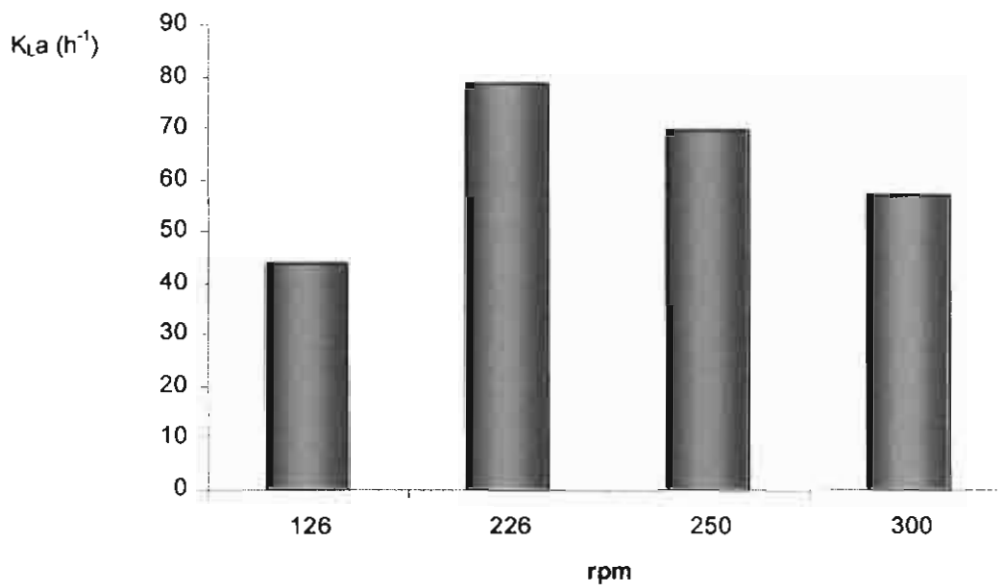
Teniendo la curva patrón, el paso siguiente fue determinar el  $Q_{O_2x}$  y el  $K_La$  a diferentes velocidades de agitación, se probaron 4 velocidades de agitación, con el fin de conocer la que nos brindaría las condiciones óptimas en lo referente a la transferencia de oxígeno, ya que la productividad de un fermentador esta determinada por el coeficiente de transferencia de masa ( $K_La$ ) cuyo valor a su vez depende de las características físicas y de operación de éste, además de que se debe satisfacer que la transferencia sea mayor que la demanda para evitar limitaciones de oxígeno, los resultados se muestran en la tabla 9 y gráfico 3.

Tabla 9. Transferencia de oxígeno a diferentes velocidades de agitación.

Velocidad de agitación rpm	$K_La$ ( $h^{-1}$ )
126	43.92
226	78.84
250	69.48
300	57.29

Se considera que los valores típicos de  $K_{La}$  para tanques agitados son de  $60 \text{ h}^{-1}$  a  $240 \text{ h}^{-1}$  <sup>(21)</sup>, considerando lo anterior, observamos que los valores de  $K_{La}$  obtenidos con 226 rpm y 250 rpm, cumplen con lo antes mencionado y el valor de  $K_{La}$  máximo se obtuvo con la velocidad de agitación de 226 rpm, lo que significa que la transferencia de oxígeno se vió favorecida con esta velocidad de agitación y por tanto el suministro de oxígeno no estuvo limitado en el sistema.

Gráfico 3. Transferencia de oxígeno a diferentes velocidades de agitación.



Los valores obtenidos de  $Q_{O_2X}$  y  $K_{La}$  puntual, así como la cantidad de células expresado en peso seco a diferentes rpm se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Transferencia y demanda de oxígeno a diferentes velocidades de agitación.

Velocidad de agitación rpm	$K_{La}$ (puntual) $h^{-1}$	$Q_{O_2x}$ (mmol $O_2$ / g células-h)	Peso seco g/mL
126	12.87	0.686	1.64 e-4
226	18.28	0.824	2.73e-4
250	24.45	0.875	2.92e-4
300	28.65	0.591	3.74e-4

Si analizamos el valor de  $Q_{O_2x}$  se aprecia que llega a un máximo relativo en 250 rpm, este parámetro nos indica el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos, por tanto, en estas condiciones es donde se tuvo un consumo máximo de oxígeno y se esperaba tener la mayor concentración de biomasa.

El método de determinación de peso seco para la medición de biomasa, presentó un inconveniente, ya que el valor obtenido de peso seco, no fue solo representativo de las células vivas, sino que también incluyó a las células muertas. Por lo tanto, tomando en cuenta esta consideración, no fue la mejor opción basar el análisis solo en el valor de peso seco, porque a pesar de tener la mayor concentración de biomasa a 300 rpm, no significó que todas las células eran viables. Esto se pudo confirmar con el valor de  $Q_{O_2x}$ , a 300 rpm fue aproximadamente 0.3 unidades menores que a 250 rpm, la razón de estos resultados, pudo ser que a 300 rpm se estuviese dañando la integridad celular y/o provocando muerte celular, por consiguiente una disminución en el consumo de oxígeno.

Con lo anterior se pudo inferir que la velocidad óptima de agitación es de 250 rpm, sin embargo si comparamos los valores obtenidos con 226 rpm, tanto en peso seco y  $Q_{O_2x}$ , no se encontró una diferencia importante, prácticamente se obtuvieron valores similares. Recordemos que un factor importante para el escalamiento de procesos es el gasto energético que demanden, por lo tanto, es

esencial buscar condiciones que nos aseguren un crecimiento celular aceptable y que a su vez representen el mínimo gasto energético posible, por ello se seleccionó la velocidad de agitación de 226 rpm como la adecuada para llevar a cabo el crecimiento celular.

### **7.3 Estudio cinético del proceso de biotransformación con células en reposo.**

En este estudio, lo primero que se evaluó fue la influencia de la *N,N*-dimetilformamida (DMF) sobre la integridad y actividad de las células, para ello se realizaron seis experimentos.

La DMF es un disolvente orgánico completamente miscible en agua y en algunos compuestos orgánicos, en la presente investigación se empleó como co-solvente para la adición del sustrato, la toxicidad de un disolvente orgánico mantiene una estrecha relación con  $\log P_{ow}$ , el cual se define como el logaritmo del coeficiente de partición de una sustancia entre agua y *n*-octanol, se ha reportado que disolventes cuyos valores de  $\log P_{ow}$  se encuentran entre 1.5 y 4.0 son extremadamente tóxicos para las bacterias, y los que tienen valores superiores a este rango no suelen ser tóxicos<sup>(57)</sup>, el valor reportado del  $\log P_{ow}$ , para la DMF es de - 0.87 a - 1.083<sup>(58-60)</sup> por tanto se tenía la posibilidad que fuera tóxica para las células.

Debido a lo anterior fue necesario evaluar el porcentaje tolerado por los microorganismos, y que a su vez no afectara el proceso de biotransformación.

Las muestras de la biotransformación con una relación sustrato/células p/p 1:100, se analizaron por CLAR, solo con el 0.6%(v/v) de DMF se obtuvo la señal correspondiente a la 4-clorobenzofenona, lo cual indicaba que este porcentaje no fue tóxico para las bacterias y que el proceso de biotransformación se llevó a cabo.

Posteriormente se probaron tres distintas relaciones sustrato/células p/p (1:20, 1:50 y 1:100), manteniendo constante en todos los casos el porcentaje de DMF en 0.6%, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Porcentaje de conversión y de relación enantiomérica del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol

Relación Sustrato/células	Tiempo de muestreo (hrs)	% de relación enantiomérica		% de conversión	
		Enantiómero ( <i>R</i> )	Enantiómero ( <i>S</i> )	Cetona	Alcohol
1:20	36	55.85	44.15	10.10	89.90
	48	57.07	42.93	10.45	89.55
	60	56.36	43.64	10.17	89.83
	72	56.07	43.93	7.84	92.16
1:50	24	67.28	32.72	19.36	80.64
	48	68.04	31.96	27.97	72.03
	72	71.85	28.15	36.54	63.46
1:100	36	92.54	7.46	55.91	44.09
	48	65.01	34.99	47.30	52.70
	60	65.67	34.33	23.21	76.79

Durante el proceso de biotransformación el (*S*)-4-clorobencidrol se oxidó para formar la 4-clorobenzofenona, por lo tanto el enantiómero (*R*) debió enriquecerse conforme avanzó el tiempo de biotransformación, idealmente si se llevara a cabo en su totalidad la oxidación enantioselectiva se obtendrían valores de relación enantiomérica  $R/S= 100/0$ , y el análisis del % de conversión se esperaba que la relación alcohol/cetona fuese del 50/50.

Es importante considerar el tiempo al cual se obtuvieron las relaciones anteriormente mencionadas, ya que lo que se buscó fue alcanzar en el período de tiempo más corto posible, los mejores porcentajes de conversión y de relación enantiomérica.

Al incrementarse la cantidad de células presentes en el medio de reacción, la concentración de enzima presente se vería incrementada, y por tanto los valores de % de conversión y relación enantiomérica se obtendrían en un período de tiempo más corto, por este motivo es que los tiempos de muestreo para cada

una de las relaciones sustrato/células p/p fueron diferentes, siendo mejor cuando se trabajó la relación 1:100.

Con la relación 1:20, el tiempo de muestreo se extendió hasta las 72 horas, sin embargo fue a las 48 horas cuando se obtuvo el valor más alto de porcentaje de conversión 10.45%, y a las 72 horas se obtuvo un valor de 7.84% de conversión, esto planteó la posibilidad de que el proceso pudiese ser reversible bajo estas condiciones. La relación 1:50 no mostró tal comportamiento, conforme avanzó el proceso de biotransformación los valores de % de conversión aumentaron y la relación enantiomérica se vio favorecida hacia el enantiómero (*R*), teniendo los valores máximos a las 72 horas (36.54% de conversión, con 71.85% de (*R*)-4-clorobencidrol). Finalmente con la relación 1:100, los valores máximos se obtuvieron a las 36 horas, y a partir de este tiempo se observó que los valores de conversión a cetona disminuyeron conforme aumentó el tiempo, lo cual nuevamente planteó la posibilidad de reversibilidad.

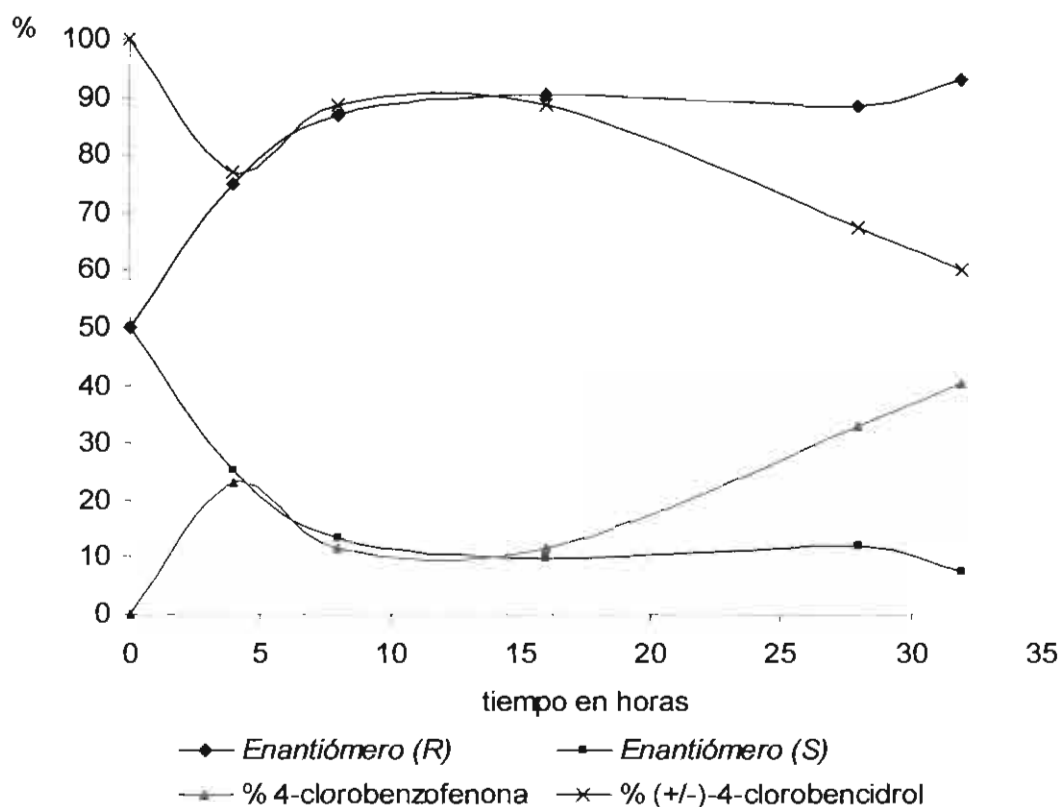
Comparando los tiempos donde se obtuvieron los valores máximos de bioconversión usando las relaciones 1:50 y 1:100 de sustrato/célula p/p, se constató que conforme aumentó la concentración de células, el tiempo del proceso de biotransformación disminuyó.

A partir de estos resultados se consideró la relación 1:100 como la mejor, por lo que se decidió realizar otro lote, acortando los tiempos de muestreo, los resultados se muestran en la tabla 12 y en el gráfico 4.

Tabla 12. Porcentaje de relación enantiomérica y porcentaje de conversión del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol

Relación sustrato/células	Tiempo de muestreo (hrs)	% de relación enantiomérica		% de conversión	
		Enantiómero (R)	Enantiómero (S)	Cetona	Alcohol
1:100	4	74.70	25.30	23.00	77.00
	8	86.60	13.40	11.60	88.40
	16	90.34	9.66	11.60	88.40
	28	87.95	12.05	33.00	67.00
	32	92.77	7.23	40.34	59.66

Gráfico 4. Porcentaje de relación enantiomérica y porcentaje de conversión del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol,



Del análisis de los resultados se infiere que la relación 1:100 sustrato/células p/p fue la que arrojó mejores resultados para la conversión del (S)-4-clorobencidrol donde se obtuvo el 40.34 % de la 4-clorobenzofenona, a las 32hrs.

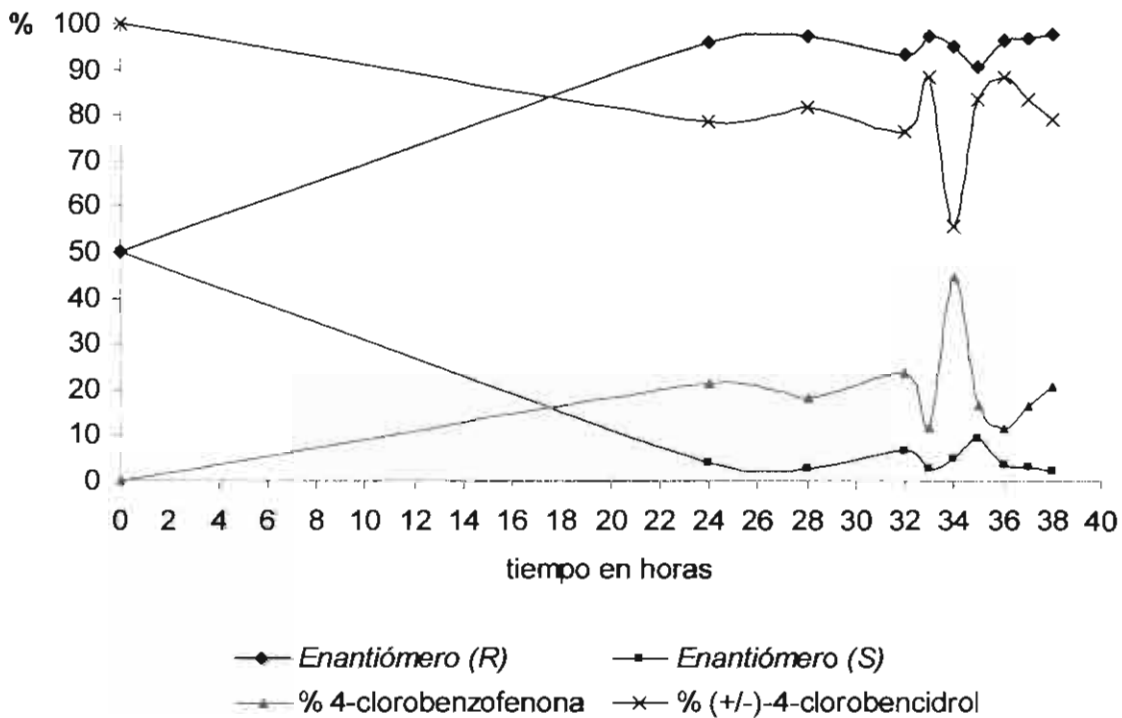
Con el fin de conocer el tiempo óptimo del proceso de biotransformación se realizó otro experimento manteniendo las condiciones y muestreando de las 24 a las 32 horas cada 4 horas y de las 32 a las 38 cada hora, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13 y en el gráfico 5.

Tabla 13. Porcentaje de relación enantiomérica y porcentaje de conversión del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol.

Relación sustrato/células	Tiempo de muestreo (hrs)	% de relación enantiomérica		% de conversión	
		Enantiómero (R)	Enantiómero (S)	Cetona	Alcohol
1:100	24	95.98	4.02	21.40	78.60
	28	97.52	2.48	18.07	81.93
	32	93.34	6.66	23.34	76.66
	33	97.42	2.58	11.50	88.50
	34	95.13	4.87	44.25	55.75
	35	90.75	9.25	16.58	83.42
	36	96.47	3.53	11.39	88.61
	37	96.77	3.23	16.50	83.50
	38	97.57	2.43	20.69	79.31



Gráfico 5. Porcentaje de relación enantiomérica y porcentaje de conversión del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol,



El tiempo óptimo del proceso para este experimento fue de 34 horas, ya que el porcentaje de conversión estuvo dentro del rango 50/50, aunque los valores más altos de la relación *R/S* se obtuvieron en tiempos menores o mayores a las 34 horas, no se consideró el óptimo ya que el porcentaje de conversión a la 4-clorobenzofenona estuvo en un rango del 11 al 20 %. También se logró observar que el proceso podría presentar reversibilidad, pero no de manera permanente, si se observa el gráfico 4 se aprecia que desde las 28 hasta las 38 horas, existen variaciones tanto en el % de conversión como en la relación enantiomérica, con ascensos y descensos, esto pudo ser resultado de la proporción cetona/alcohol por la reducción/oxidación en el proceso de biotransformación.

Por otro lado recordemos que la enzima que está llevando a cabo la biotransformación es una *sec*-ADH, la cual requiere de la regeneración de sus

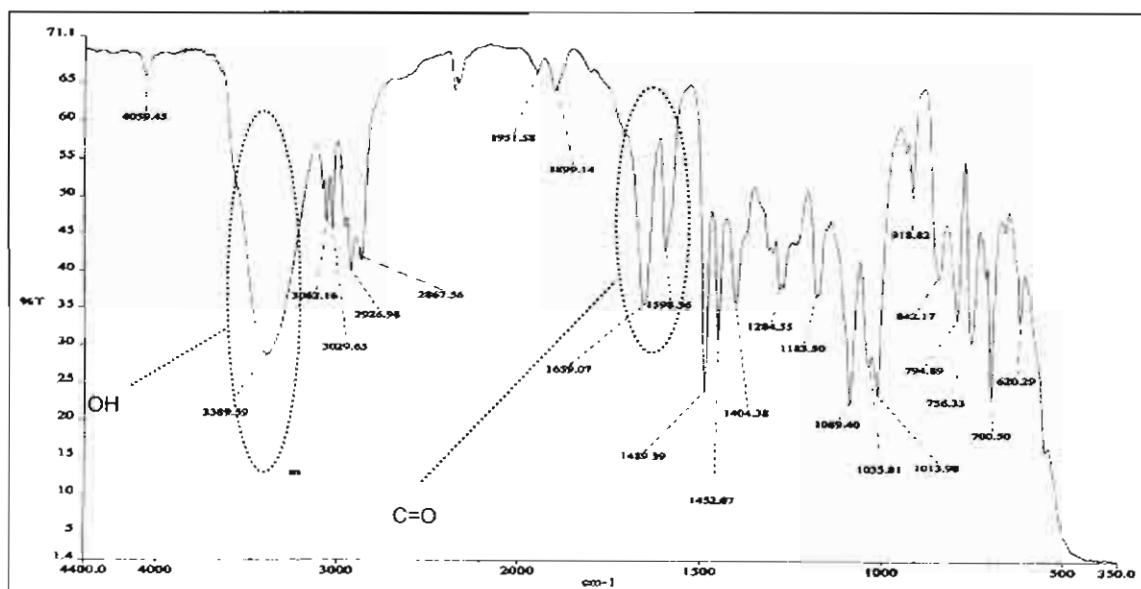
cofactores y que en especial en esta clase de enzimas, es donde se pueden presentar los fenómenos de inhibición o inestabilidad en el sistema<sup>(13)</sup>.

Como producto del proceso de biotransformación se obtuvo una cetona, que es menos polar que el alcohol del cual proviene, esta característica pudo influenciar la inhibición del proceso, ya que al ser menos polar puede tener una mayor afinidad al sitio catalítico de la enzima y es por ello que se observó en primer instancia que no se biotransforma todo el (S)-4-clorobencidrol y en segundo lugar que los porcentajes de conversión no llegan al máximo y se mantienen estables, ya que la ADH también tienen la capacidad de llevar a cabo la reacción inversa, es decir la reducción de la cetona, dando como producto su respectivo alcohol<sup>(13)</sup>.

Por lo que se infiere que el fenómeno que se presentó en este proceso pudiera ser un fenómeno de inhibición por producto<sup>(13)</sup>.

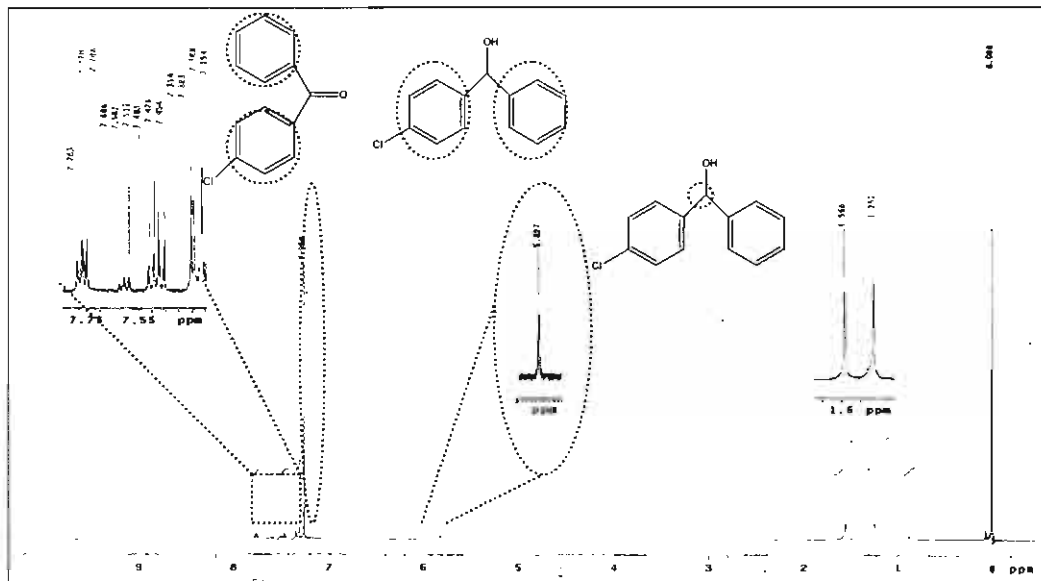
El análisis espectral mediante IR del producto (figura 7) obtenido a las 34 horas de biotransformación muestra la señal correspondientes al grupo -OH del (±)-4-clorobencidrol en  $3389\text{cm}^{-1}$  y las correspondientes al grupo C=O de la 4-clorobenzofenona en  $1659\text{ cm}^{-1}$  y  $1598\text{ cm}^{-1}$ , aparecen bien definidas y de intensidad semejante.

Figura 7. Espectro de infrarrojo, mezcla cruda de biotransformación a las 34 horas.



El espectro de  $^1\text{HRMN}$  se muestra a continuación figura 8, en 5.827 ppm y 7.259 ppm se aprecian las señales correspondientes al ( $\pm$ )-4-clorobencidrol y de 7.2 ppm a 7.8 ppm, el conjunto de señales correspondientes a la 4-clorobenzofenona.

Figura 8. Espectro de  $^1\text{HRMN}$ , mezcla cruda de biotransformación a las 34 horas.



Se realizó un experimento donde como sustrato se adicionó únicamente la 4-clorobenzofenona, relación sustrato/células p/p 1:100, para conocer si el proceso de biotransformación requería la presencia del alcohol, los resultados obtenidos mostraron que el proceso de reducción de la 4-clorobenzofenona, no se llevó a cabo, a pesar de que el tiempo de biotransformación fue de 73 horas, lo cual indicó que para que dicho proceso se pudiera llevar a cabo, el sistema requeriría de la presencia del alcohol.

Para confirmar si la cetona se reduce en presencia del alcohol se realizó un experimento donde se adicionó como sustrato una mezcla 50/50 del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol y 4-clorobenzofenona, los resultados obtenidos se muestran a continuación en la tabla 14.

Tabla 14. Porcentaje de relación enantiomérica y porcentaje de conversión de la mezcla 50/50 de ( $\pm$ )-4-clorobencidrol y 4-clorobenzofenona.

Relación sustrato/células	Tiempo de muestreo (hrs)	% de relación enantiomérica		% de conversión	
		Enantiómero ( <i>R</i> )	Enantiómero ( <i>S</i> )	Cetona	Alcohol
1:100	24	40.57	59.43	49.83	50.17
	48	40.37	59.63	37.35	62.65
	73	28.34	71.66	38.79	61.21

Con los resultados obtenidos a las 48 horas se pudo observar que la enzima involucrada (*sec*-ADH), tiene la capacidad de reducir la cetona al alcohol, es por ello que el porcentaje de conversión correspondiente al alcohol aumento conforme el tiempo de biotransformación transcurrió, también se observó que inverso al proceso de oxidación, durante la reducción de la cetona el enantiómero (*S*) se enriqueció.

A las 73 horas los valores del enantiómero (*R*) disminuyeron, pero no se vio reflejado en el porcentaje de conversión de la cetona, debido a que en el proceso de oxidación el enantiómero que se biotransforma es el (*S*), con esto se pudo inferir que el enantiómero (*R*) bajo estas condiciones podría estar siendo empleado por los microorganismos en un proceso diferente a la oxidación, ya sea que se este degradando o lo este incorporando a su metabolismo.

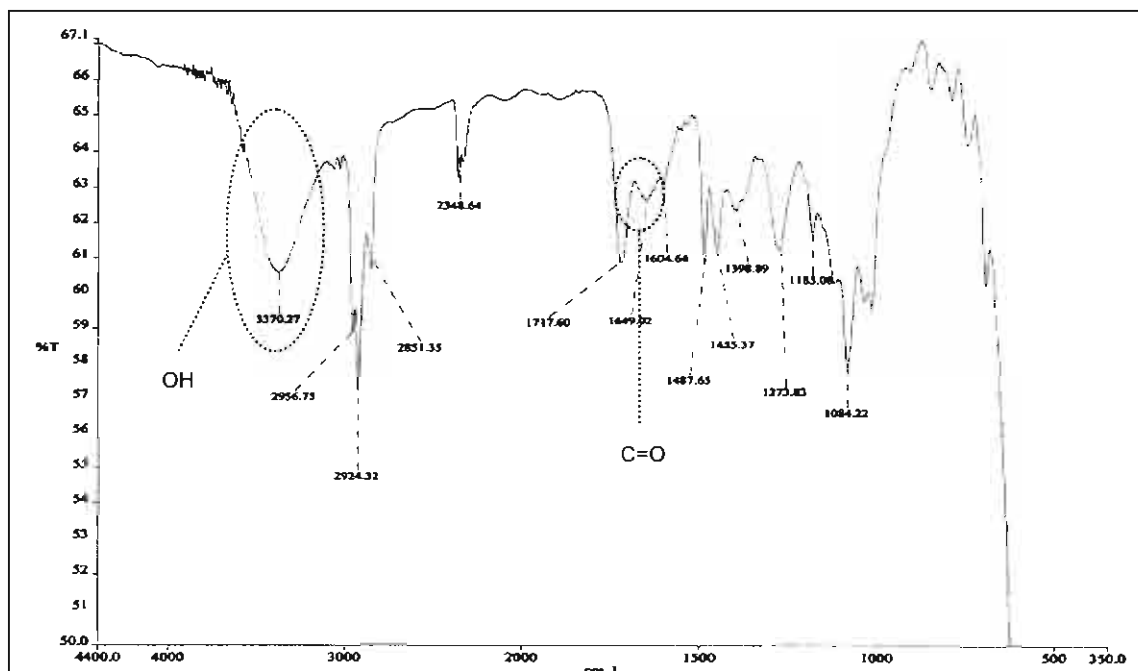
Como se mencionó en el punto 2.14, una de las alternativas para regenerar los cofactores que emplea la ADH, es el uso de un co-sustrato susceptible a ser reducido, Wolfgang y colaboradores reportaron el empleo de la acetona en un 20%(v/v) como co-sustrato<sup>(29)</sup>, con el fin de conocer la influencia de un co-sustrato en el sistema, se realizó un experimento donde se agregó acetona (20% v/v), los resultados obtenidos se muestran en la tabla 15:

Tabla 15. Porcentaje de relación enantiomérica y porcentaje de conversión del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol y acetona 20% v/v

Relación sustrato/células	Tiempo de muestreo (hrs)	% de relación enantiomérica		% de conversión	
		Enantiómero (R)	Enantiómero (S)	Cetona	Alcohol
	0	56.56	43.44	3.86	96.14
1:100	24	53.33	46.67	1.95	98.05
	28	50.06	49.94	2.26	97.74

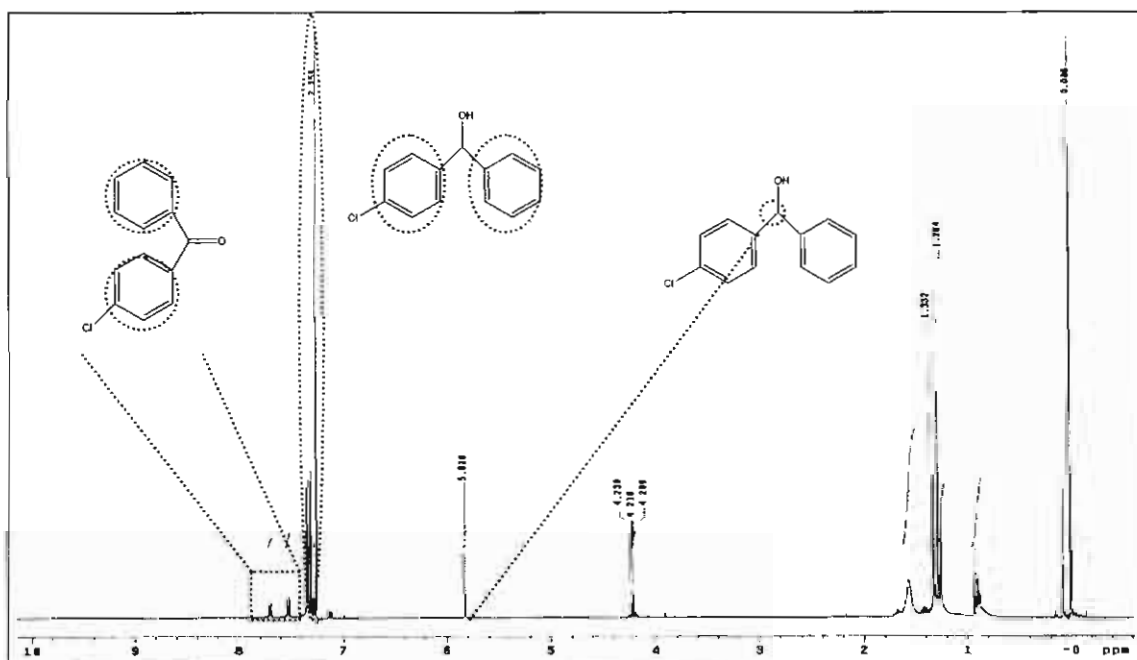
Los resultados obtenidos mostraron que el proceso de biotransformación prácticamente no se llevó a cabo con el porcentaje de acetona manejado, los valores de relación enantiomérica fueron muy cercanos al 50/50 y por tanto los valores de porcentaje de conversión a cetona fueron bajos, el análisis por IR del producto obtenido se muestra en la figura 9.

Figura 9. Espectro de infrarrojo, producto de biotransformación a las 28 horas del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol y acetona 20% v/v



Se observó una señal bien definida, intensa y característica del grupo OH del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol a  $3370\text{ cm}^{-1}$  y en  $1649\text{ cm}^{-1}$  se observó una pequeña señal, la cual corresponde al grupo C=O de la 4-clorobenzofenona, lo cual confirmó que el producto obtenido fue una mezcla de alcohol/cetona, pero en el cual la proporción de alcohol fue mayor.

Figura 10. Espectro de  $^1\text{HRMN}$ , producto de biotransformación a las 28 horas, ( $\pm$ )-4-clorobencidrol y acetona 20% v/v



El espectro de  $^1\text{HRMN}$  se muestra en la figura 10, en 5.826 ppm y 7.259 ppm se aprecian las señales correspondientes al ( $\pm$ )-4-clorobencidrol y de 7.2 ppm a 7.8 ppm, el conjunto de señales correspondientes a la 4-clorobenzofenona.

#### 7.4 Proceso de biotransformación en fermentador de 3 litros.

Se realizó primero un lote conforme a lo descrito en el punto 6.5 con 24 horas de biotransformación, la cual se analizó por CLAR y CG, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Porcentaje de relación enantiomérica y porcentaje de conversión del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol

Relación Sustrato/células	Tiempo de muestreo (hrs)	% de relación enantiomérica		% de conversión	
		Enantiómero ( <i>R</i> )	Enantiómero ( <i>S</i> )	Cetona	Alcohol
1:100	24	56.29	43.71	3.25	96.75

Como se observo, la relación enantiomérica obtenida fue muy cercana al 50/50 y el porcentaje de conversión para la cetona fue bajo (3.25%), lo cual pudiera ser indicativo de dos posibilidades:

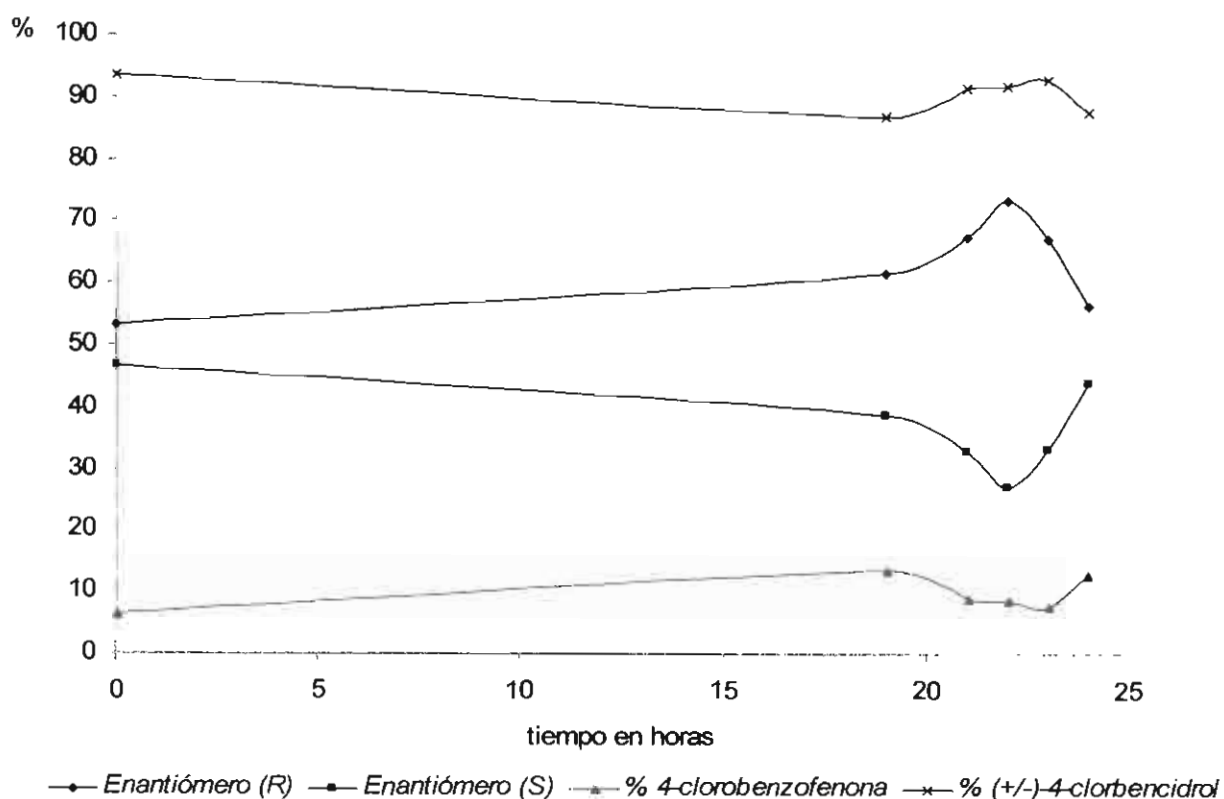
- 1.- Que el proceso de biotransformación requería de mayor tiempo para obtener mejores porcentajes de conversión.
- 2.- Que posiblemente al igual que con las células en reposo dentro del proceso de biotransformación, pudiere presentarse el fenómeno de inhibición por producto y a este tiempo de muestreo ya se hubiera rebasado el tiempo máximo de bioconversión.

Por lo cual se decidió, realizar otro experimento manteniendo las mismas condiciones de operación y acortando el tiempo de muestreo, los resultados se muestran en la tabla 17 y el gráfico 6.

Tabla 17. Porcentaje de relación enantiomérica y porcentaje de conversión del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol

Relación Sustrato/células	Tiempo de muestreo (hrs)	% de relación enantiomérica		% de conversión	
		Enantiómero (R)	Enantiómero (S)	Cetona	Alcohol
1:100	0	53.2	46.8	6.49	93.51
	19	61.32	38.68	13.34	86.66
	21	67.12	32.88	8.82	91.18
	22	73.18	26.82	8.29	91.71
	23	66.97	33.03	7.50	92.50
	24	56.02	43.98	12.78	87.22

Gráfico 6. Porcentaje de relación enantiomérica y porcentaje de conversión del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol





Los resultados mostraron que el mejor porcentaje de conversión para la cetona se obtuvo a las 19 horas (13.34%), sin embargo con las muestras analizadas en el periodo de tiempo comprendido entre las 19 y 24 horas se observó que el porcentaje de conversión disminuye e incrementa, llegando a un 12.78% a las 24 horas.

Se decidió probar alargando el tiempo de biotransformación hasta 48 horas donde se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 18 y el gráfico 7.

Tabla 18. Porcentaje de relación enantiomérica y porcentaje de conversión del (±)-4-clorobencidrol

Relación sustrato/células	Tiempo de muestreo (hrs)	% de relación enantiomérica		% de conversión	
		Enantiómero (R)	Enantiómero (S)	Cetona	Alcohol
1:100	0	55.36	44.64	4.52	95.48
	24	71.02	28.98	12.21	87.79
	48	85.18	14.82	17.08	82.92

Gráfico 7. Porcentaje de relación enantiomérica y porcentaje de conversión del (±)-4-clorobencidrol.

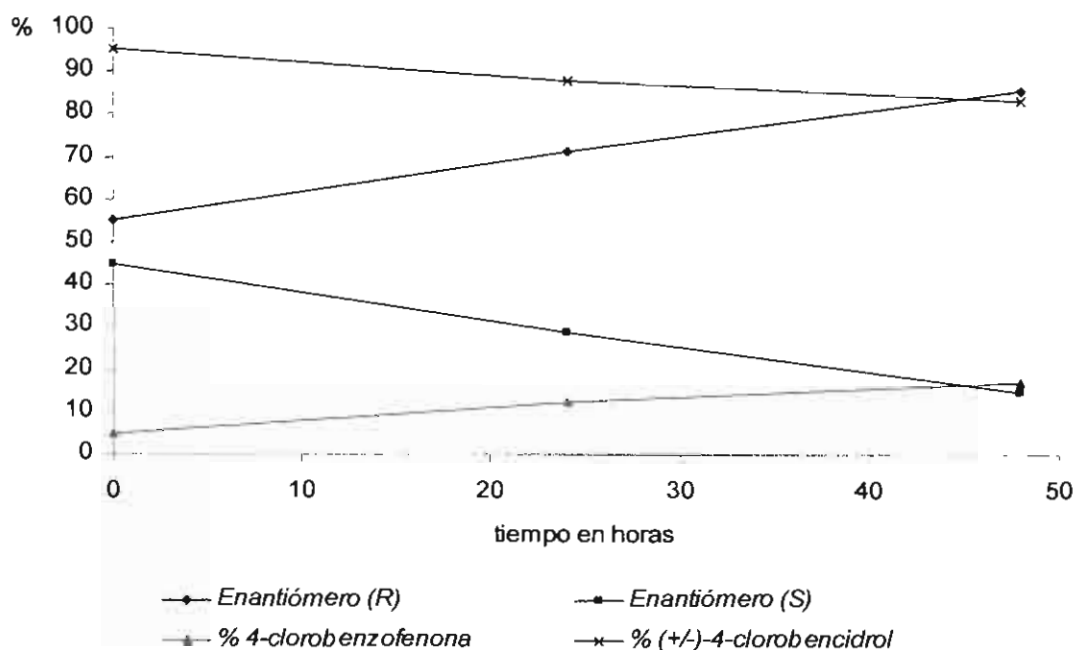
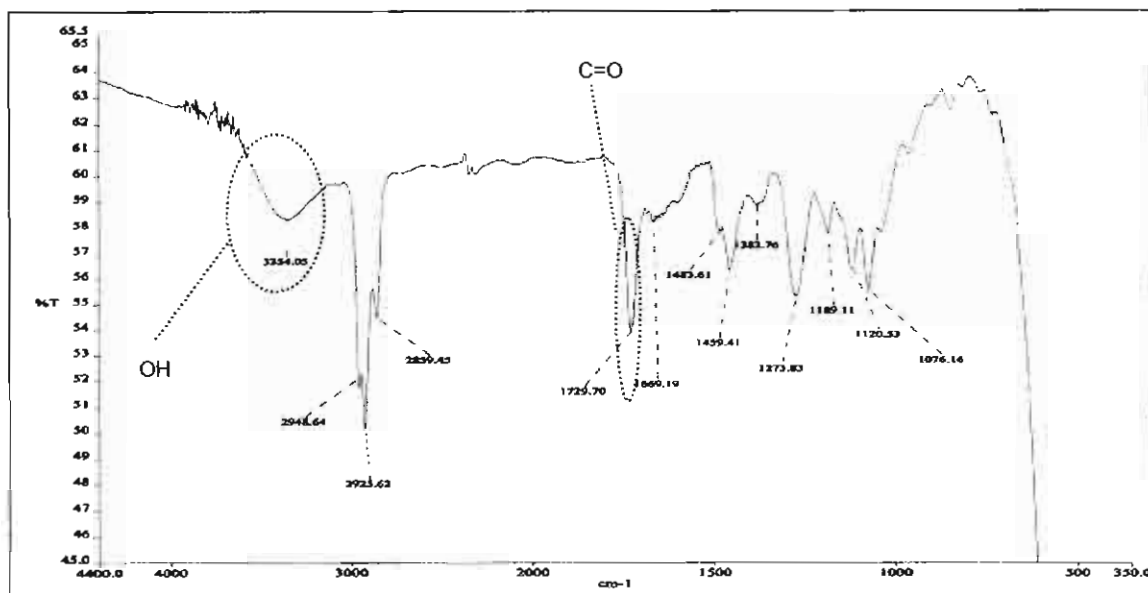
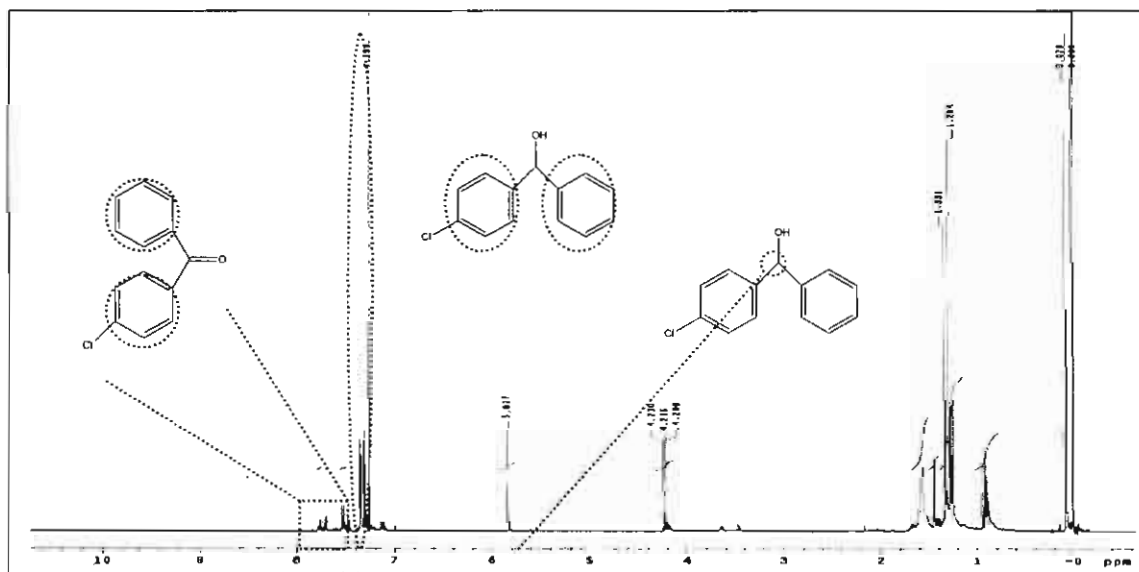


Figura 11. Espectro de infrarrojo, producto de biotransformación a las 48 horas del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol



El espectro de  $^1\text{HRMN}$  se muestra a continuación figura 12, en 5.827 ppm y 7.259 ppm se aprecian las señales correspondientes al ( $\pm$ )-4-clorobencidrol y de 7.2 ppm a 7.8 ppm, el conjunto de señales correspondientes a la 4-clorobenzofenona.

Figura 12. Espectro de  $^1\text{HRMN}$ , producto de biotransformación a las 48 horas del ( $\pm$ )-4-clorobencidrol



Los valores obtenidos mostraron que el valor de conversión a cetona más alto se obtuvo con un tiempo de biotransformación de 48 horas, sin embargo se esperaba que los valores de relación enantiomérica  $R/S= 100/0$ , y en el análisis del % de conversión alcohol/cetona fuesen del 50/50, analizando los valores de porcentaje de conversión y relación enantiomérica a las 48 horas se observó que el valor de porcentaje de conversión a cetona fue de 17.08%, y de relación enantiomérica fue 85.18/14.82, con este valor de relación enantiomérica se esperaba que el porcentaje de cetona fuese mayor, ya que el enantiómero ( $S$ ) es el sustrato que se oxida para formar la cetona.

Una posible explicación de el por qué ocurrió este fenómeno en el proceso de biotransformación, es el asumir que el microorganismo degradó o pudo incorporar al sustrato en su metabolismo, o que algún componente presente en el medio de crecimiento este interfiriendo en el proceso de biotransformación.

La existencia de otro factor que pudiera afectar al proceso de biotransformación es el fenómeno de inhibición por producto; como se observó en el gráfico 7, en el lapso comprendido entre las 19 y las 24 horas.

El objetivo del proceso de biotransformación fue obtener un compuesto enriquecido enantioméricamente, por lo tanto el tiempo de biotransformación al cual se obtuvo un valor mayor para el enantiómero ( $R$ ) fue a las 48 horas.

## 8. CONCLUSIONES.

- Las condiciones óptimas para determinar la relación enantiomérica mediante CLAR empleando una columna OB-H, fueron: composición de la fase móvil 90:10 de hexano:isopropanol, velocidad de flujo= 0.8 mLmin<sup>-1</sup>, T=24°C y  $\lambda$ =230nm.
- Las condiciones óptimas para determinar el porcentaje de conversión mediante CG empleando una columna HP-5, fueron: velocidad de flujo= 0.8 mLmin<sup>-1</sup>, T<sub>inyector</sub>=250°C, T<sub>detector</sub>=250°C y T<sub>horno</sub>=180°C, gas acarreador N<sub>2</sub>.
- Las condiciones de operación del fermentador de 3 litros para una adecuada producción de biomasa fueron: velocidad de agitación 226rpm, T=30°C, vvm=0.9 y volumen de trabajo= 2.2 L.
- La oxidación del (±)-4-clorobencidrol con células en reposo de *Nocardia corallina* B-276 procedió de manera enantioselectiva, siendo la relación sustrato:células 1:100 y 0.6% de DMF, con la que se obtuvo el mayor porcentaje de conversión a cetona (44.25%) y una relación enantiomérica R/S de 95.13%/4.87%, con un tiempo de biotransformación de 34 horas.
- La oxidación del (±)-4-clorobencidrol en fermentador de 3 litros procedió de manera enantioselectiva, obteniéndose un porcentaje de conversión a cetona del 17.08% y una relación enantiomérica R/S 85.18%/14.82% a las 48 horas de biotransformación. Con una relación sustrato:células 1:100, 0.6% de DMF y 100 mL de *n*-octano.
- En el proceso de oxidación enantioselectiva del (±)-4-clorobencidrol pudiera presentarse un fenómeno de inhibición.
- En el proceso de oxidación enantioselectiva del (±)-4-clorobencidrol se observó que se podrían llevar a cabo reacciones de oxidación y de reducción.

## 9. REFERENCIAS.

- 1.- Cárdenas H., *Las ciencias farmacéuticas: algunos aspectos de actualidad*, México, UAM, 2003, pp. 260-263.
- 2.- Lehninger A., *Bioquímica*, 2a. ed., Edit. Omega, Barcelona, 1985, pp. 223, 2582.
- 3.- Sheldon R., *Chirotechnology*, Edit. Marcel Dekker Inc., NY, 1993, pp. 39-67.
- 4.- McMurry J., *Química Orgánica*, 5a. ed., Edit. International Thomson, México, 2000, pp. 245, 342.
- 5.- Secretaria de Salud, *Hacia una política farmacéutica integral para México* México, 2005, pp. 144-146.
- 6.- Luna H., *Rev. Soc. Quím. Méx.*, 48, 211-219, (2004).
- 7.- Bu'lock J., Kristiansen B., *Biología Básica*, Edit. Academic Press, Londres, 1991.
- 8.- Pras N., Wondenbag H., Van Uden W., *Bioconversion of Naturally Occurring Precursors and Related Synthetic Compounds Using Plant Cell Cultures*; Edit. Macek and Vanek, 1994, pp 37 – 45.
- 9.- Roberts S., *Tetrahedron*, 60, 499-500, (2004).
- 10.- Adrie JJ., Sven P., Andreas S., *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 548-556, (2002).
- 11.- *Pure & Appl. Chem.*, IUPAC, UK, 70, No. 5, 1998, 1129-1143.
- 12.- Gerhartz W., *Enzymes in Industry Production and Applications*, Edit. VCH, Alemania, 1990.
- 13.- Faber K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4a ed, Edit. Springer, Alemania, 2000, pp. 21-22, 220-221.
- 14.- <http://www.uniovi.es/vicinves/portal/ot/activos/062.pdf>, fecha de consulta 08/05.
- 15.- Daniel D., Scott A., *J. Bacteriology*, 181, 2752-2758, (1999).
- 16.- Collins P., Knowles C., *J. Gen. Microbiology*, 129, 248-254, (1983).
- 17.- <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/cap14/>, fecha de consulta 08/05.

- 18.- <http://www.med-chem.com/procedures/Kinyoun.html>, fecha de consulta 06/06.
- 19.- Pérez H. I., Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México, D.F., 1998.
- 20.- Solomons G.L., *Materials and Methods in Fermentation*, Academic Press, Londres, 1969.
- 21.- Quintero R., *Ingeniería Bioquímica*, Ed. Alhambra Mexicana, México, 1993, pp. 86-100.
- 22.- Miura T.K., *Adv. Biochem. Eng.*, 4, 3-40, (1976).
- 23.- Taguchi H., Humphrey A.E., *J. Ferment. Technol.*, 44, 881-889, (1966).
- 24.- Scribani R., *Biología*, 2a. ed., Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, 1984.
- 25.- Crueger W., Crueger A., *Biología: Manual de microbiología industrial*, Ed. ACRIBIA, S. A., España, 1989.
- 26.- Takahashi O, Furuhashi., Preparation of optically active, 4-hydroxy-4-methyl-1-alkynes Japanese patent, 15, 039/1990. Chem. Abstr. 113:5708.
- 27.- Luna H., Prasad O., *Repic Biocatalysis*, 8, 155, (1993).
- 28.- Willets A., Knowles C., Levitt M., Roberts S., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, I, 1608, (1991).
- 29.- Wolfgang S., Birgit K., Kurt F., Wolfgang K., *Angew. Chem. Int.*, 41(6), 1014-1017, (2002).
- 30.- Davies H., Green R., Nelly D., Roberts S., *Biotransformation in preparative organic chemistry*, Academic Press, London, 1989, pp. 157-219.
- 31.- Shimizu S., Hattori S., Hata H., Yamada H., *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 519-522, (1987).
- 32.- Fantin G., Fogagnolo M., Giovannini P., Medici A., Pedrini P., *Tetrahedron: Asymmetry*, 6, 3047-3053, (1995).
- 33.- Fantin G., Fogagnolo M., Medici A., Pedrini P., Fontana S., *Tetrahedron: Asymmetry*, 11, 2367-2373, (2000).
- 34.- Pérez H., Luna H., Manjarrez N., Solís A., Nuñez M., *Tetrahedron: Asymmetry*, 11, 4263-4268, (2000).
- 35.- Zhan B., Thompson A., *Tetrahedron*, 60, 2917-2935, (2004).

- 36.- Sharpless, K., *Chemtech*, 15, 692, (1985).
- 37.- O'Sullivan, D., *Chem. Eng. News*, 59, 64-69. (1981).
- 38.- Gao I., *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 5765-5780, (1987).
- 39.- Gao I., *Chem Week*, 146, 29, (1990)
- 40.- Lee N., *Tetrahedron Lett.*, 32, 5055-5058, (1991).
- 41.- Bergmann R., *J. Med. Chem.*, 33, 2759-2767, (1990).
- 42.- Hurd C., *J. Am. Chem. Soc.*, 55, 1082-1084, (1933).
- 43.- Ho T-L., *Synth. Commun.*, 5(4), 309-313, (1975).
- 44.- Csuros Z., *Chem. Eng.*, 18(3), 249-261, (1974).
- 45.- Masakazu T., *J. Chem. Soc. Japan*, 55, 291-293, (1952).
- 46.- Kimura R., *Bull. Inst. Chem. Research, Kyoto Uni.*, 34, 250-254, (1956).
- 47.- Tsutomu K., *Chem. Abstr.*, 47, 11248a, (1953).
- 48.- Midorikawa K., *Chem. Abstr.*, 54, 1544a, (1960).
- 49.- Francis A. Carey, *Organic Chemistry*, 4a. ed., Ed. McGraw Hill-Higher Education, USA, 2000, pp. 507, 610, 611.
- 50.- Ohkuma T., Koizumi M., Ikehira H., Yokozawa T., Noyori R., *Org. Lett.*, 2(5), 659-662, (2000).
- 51.- Kleemann, A., Engel, J., *Pharmaceuticals. Synthesis, Patents, Uses*, 2a ed., (Pharmazeutische Wirkstoffe. Synthesen, Patente, Anwendungen) Fed. Rep. Ger. (1982), pp. 1040, Publisher: (Thieme, Stuttgart, Fed. Rep. Ger.) DM 290.
- 52.- McCalmont, W.F., Heady, T.N., Paterson, J.R., Lindenmuth, M.A., Haverstick, D.M., Gray, L.S., Macdonald, T.L., *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 14(14), 3691-3695, (2004).
- 53.- Avendaño M., *Introducción a la Química Farmacéutica*, Ed. McGraw Hill, México, 2001, cap. 28.
- 54.- Yamada S., Katsumata H., *J. Org. Chem.*, 64, 9365-9373, (1999).
- 55.- Pérez H., Luna H., Manjarrez, N., Solís A., *Tetrahedron Asymmetry*, 12, 1709-1712, (2001).
- 56.- Wu B., Mosher H., *J. Org. Chem.*, 51, 1904-1906, (1986).
- 57.- Ramos L., *Annual Review of Microbiology*, 56, 743-768, (2002).

- 58.- <http://www.mtas.es/insht/ipcsnspn/nspn0457.htm>, fichas internacionales de seguridad química, fecha de consulta 05/06.
- 59.- Berkowitz D., Hartung R. y Choi S., *Tetrahedron Asymmetry*, 10, 4513-4520, (1999).
- 60.- <http://www.piercenet.com/files/TR0056dh5-Calc-lopP.pdf>, Calculate reagent log P values to determine solubility characteristics, fecha de consulta 05/06.



## **ANEXOS**

## Determinación experimental de la transferencia de oxígeno. Técnica dinámica (régimen no estacionario).

Se ajustaron las condiciones del fermentador Applikon de 3 litros, así como la secuencia de operación conforme a lo descrito en el punto 6.3.2.

Los datos de la disminución en la concentración de oxígeno disuelto hasta llegar a valores cercanos al 40% (fase I), se registraron cada minuto con el programa Bio Xpert al llegar al 40% de oxígeno se reestableció el flujo de aire y se registró el aumento cada minuto, hasta el momento que llegara a un punto máximo y se mantuviera estable (fase II). (para mayor detalle ver gráfico 1)

Con los valores registrados de la fase I se determinó el  $Q_{O_2x}$  y con los valores de la fase II se determinó el  $K_La$ .

### Calculo del $Q_{O_2x}$ .

Teniendo estos valores, se realizó la conversión del tiempo registrado en minutos a horas y el % $O_2$  a mg  $O_2$  y posteriormente a mmol de  $O_2$ , para lo cual se consideró que el 100% de  $O_2 = 7.59$  mg de  $O_2$ , y para la conversión a mmol, se consideró 1mmol de  $O_2 = 32$  mg de  $O_2$ . En la tabla 19 se muestran los datos obtenidos de la fase I, con la velocidad de agitación de 226 rpm:

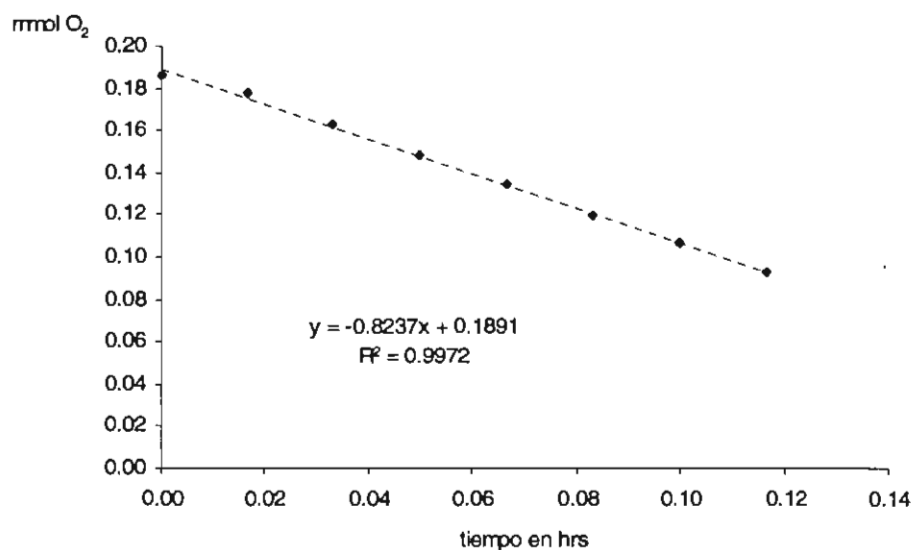
Tabla 19. Datos de la disminución en la concentración de  $O_2$  disuelto en el fermentador de 3 litros, velocidad de agitación 226 rpm.

tiempo min	tiempo hrs	% $O_2$	mg $O_2$	mmol $O_2$
0	0.00	78.30	5.94	0.19
1	0.02	75.00	5.69	0.18
2	0.03	68.90	5.23	0.16
3	0.05	62.60	4.75	0.15
4	0.07	56.60	4.30	0.13
5	0.08	50.40	3.83	0.12
6	0.10	44.80	3.40	0.11
7	0.12	39.20	2.98	0.09
8	0.13	38.90	2.95	0.09

Teniendo estos valores se graficó el tiempo en hrs vs. mmol de  $O_2$ , como se aprecia en el gráfico 8, se obtuvo la ecuación del gráfico por regresión lineal.

De la ecuación obtenida, el valor de la pendiente representó el  $Q_{O_2x}$  (mmol  $O_2$  / g células-h).

Gráfico 8. Determinación experimental de la demanda específica de oxígeno,  $Q_{O_2x}$  (mmol  $O_2$  / g células-h).



Por lo tanto para la velocidad de agitación de 226 rpm el valor de  $Q_{O_2x}$  es de 0.8237 (mmol  $O_2$  / g células-h)  $\approx$  0.824 (mmol  $O_2$  / g células-h).

### Calculo del $K_La$ .

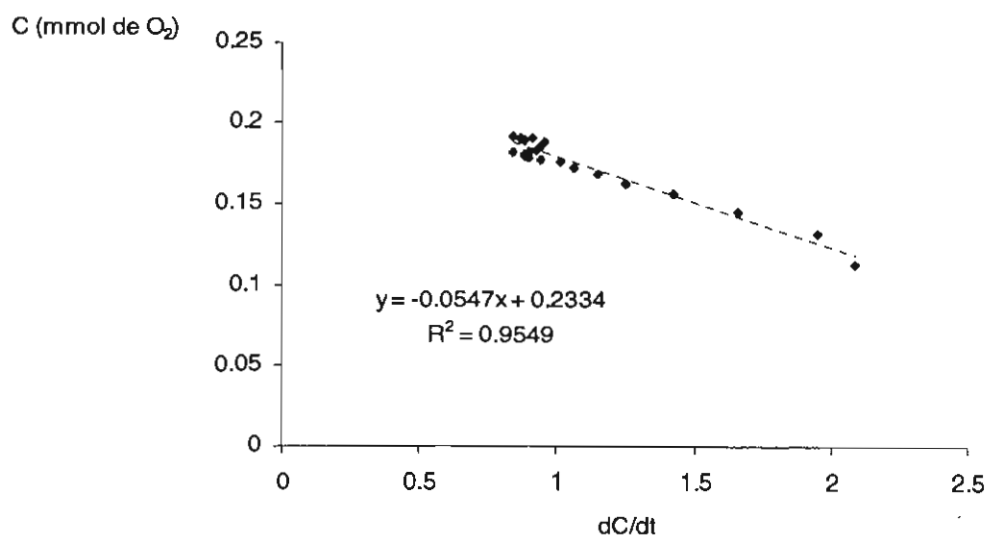
De la misma forma que para el calculo del  $Q_{O_2x}$ , se realizó la conversión del tiempo registrado en minutos a horas y el % $O_2$  a mg  $O_2$  y posteriormente a mmol de  $O_2$ , para lo cual se consideró que el 100% de  $O_2 = 7.59$  mg de  $O_2$ , y para la conversión a mmol, se consideró 1mmol de  $O_2 = 32$  mg de  $O_2$ . Los datos obtenidos de la fase II, con la velocidad de agitación de 226 rpm se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Datos en el aumento en la concentración de O<sub>2</sub> disuelto en el fermentador de 3 litros, velocidad de agitación 226 rpm.

tiempo min	tiempo hrs	% O <sub>2</sub>	mg O <sub>2</sub>	mmol O <sub>2</sub>
9	0.15	47.80	3.63	0.11
10	0.17	55.70	4.23	0.13
11	0.18	61.60	4.68	0.15
12	0.20	65.80	4.99	0.16
13	0.22	68.80	5.22	0.16
14	0.23	71.10	5.40	0.17
15	0.25	72.80	5.53	0.17
16	0.27	74.10	5.62	0.18
17	0.28	74.90	5.68	0.18
18	0.30	75.40	5.72	0.18
19	0.32	75.80	5.75	0.18
20	0.33	76.20	5.78	0.18
21	0.35	76.70	5.82	0.18
22	0.37	76.80	5.83	0.18
23	0.38	77.50	5.88	0.18
24	0.40	78.30	5.94	0.19
25	0.42	79.20	6.01	0.19
26	0.43	79.60	6.04	0.19
27	0.45	80.20	6.09	0.19
28	0.47	80.50	6.11	0.19
29	0.48	80.60	6.12	0.19
30	0.50	80.70	6.13	0.19

Con estos valores se calculó la diferencial de concentración de oxígeno (dC), la diferencial del tiempo (dt) y dC/dt. Se graficó dC/dt vs. C, obteniéndose el gráfico 9.

Gráfico 9. Determinación experimental del coeficiente de transferencia de masa, K<sub>L</sub>a (h<sup>-1</sup>).



La pendiente de la línea es igual a  $-1/K_{La}$ , para la velocidad de agitación de 226 rpm, el valor de la pendiente fue de -0.0547, por lo tanto el valor de  $K_{La} = -1/-0.0547 = 18.28 \text{ h}^{-1}$ .



# I CONGRESO NACIONAL DE QUÍMICA MÉDICA DEDICADO A INVESTIGACIÓN EN CÁNCER



*Otorga el presente reconocimiento*


A: Pérez Méndez Herminia I., Manjarrez Álvarez Norberto, Luna Héctor, Solís Oba Aida,  
Ramírez Camacho Mario A. y Ramírez Lubianos Concepción.


*Por su participación en el evento con la presentación  
del trabajo titulado:*

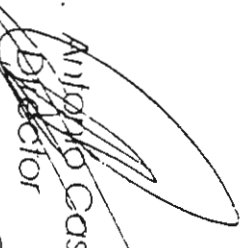
**ESTUDIO CINÉTICO PARA LA RESOLUCIÓN DEL 4-CLOROBENCIDROL, MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE  
COMPUESTOS CON ACTIVIDAD INHIBITORIA DE CÉLULAS CANCEROSAS.**

**Sede: Ciudad de Oaxaca, Oax. México, 23 al 26 de Noviembre de 2004**



  
Dra. Lenda Ruiz Azuara  
Coordinadora General del  
Proyecto de Casiopeínas  
Facultad de Química, UNAM

  
M. en C. Santiago Capello  
Director  
Facultad de Química, UNAM

  
M. en C. Antonio Castellanos  
Director  
Escuela de Ciencias Químicas  
U.A.B.J.O.

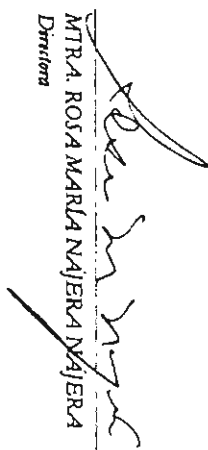
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
Maestría en Ciencias Farmacéuticas

*Organan la presente*

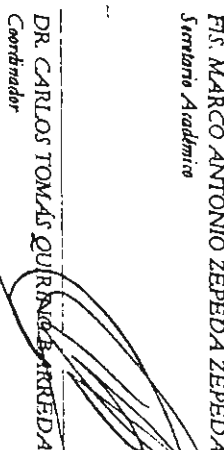
C O N S T A N C I A

A **Mario Alberto Ramirez Camacho**

*Por su participación como Ponente en la 1ª Reunión de Alumnos y Egresados de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas.  
Realizada el 7 de diciembre de 2004.*

  
MTRA. ROSA MARLA NAJERA  
*Directora*

**Marco A. Zepeda.**  
FRS. MARCO ANTONIO ZEPEDA ZEPEDA  
*Secretario Académico*

  
DR. CARLOS TOMÁS QUIRINDA BARRERA  
*Coordinador*  
*Maestría en Ciencia Farmacéuticas*

7 de diciembre de 2004



transformando el diálogo por la razón  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO



BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA, A.C.


# Reconocimiento


Herminia Inés Pérez, Mario Alberto Ramírez, Norberto Manjarrez, Héctor  
Luna, Aída Solís, Concepción Ramírez

Con la presentación del Trabajo Libre: **SEPARACIÓN DE (R)-4-CLOROBENCIDROL  
CON CÉLULAS AISLADAS DE Nocardia corallina DE SU MEZCLA RACÉMICA**

Mérida, Yucalán., del 18 al 23 de septiembre del 2005

  
Dr. Mariano Garcia Garibay  
Presidente de la SMBB

  
Dra. Anelía Farrés  
Presidente del Comité Organizador

  
Dra. Carmen Wachter  
Presidente del Comité Científico







Uso exclusivo Delegaciones Subdelegaciones de la Secretaría Economía y Oficinas Regionales IMPI

INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL  
Dirección Divisiva de Patentes

Expediente: PA/a/2005/012857  
Fecha: 29/NOV/2005 Hora: 12:07  
Folio: PA/E/2005/066372

497278



- Solicitud de Patente  
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad  
 Solicitud de Registro de Diseño Industrial
- Modelo Industrial     Dibujo Industrial

Folio de entrada

Fecha y hora de recepción

Antes de firmar le recomendamos las consideraciones generales al usuario

**I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)**

El solicitante es el inventor  El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s) UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

2) Nacionalidad (es): MEXICANA

3) Domicilio calle número colonia y código postal: PROLONGACIÓN CANAL DE MIRAMONTES No. 3855, COLONIA EX-HACIENDA DE SAN JUAN DE DIOS, C.P. 14387

Población, Estado y País: MÉXICO, D.F.

4) Teléfono (clave): 0155 5483 4193 y 0155 5483 4194    5) Fax (clave): 0155 5483 4185

**II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)**

6) Nombre (s): HERMINIA INÉS PEREZ MÉNDEZ, NORBERTO MANJARREZ ÁLVAREZ, HECTOR MANUEL LUNA CONTLA, AIDA SOLÍS OBA, CONCEPCIÓN RAMÍREZ LUBIANOS, MARIO ALBERTO RAMÍREZ CAMACHO.

7) Nacionalidad (es): MEXICANAS

8) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: FRESALES 51-B, COL. VILLA DEL PUENTE, C.P. 14325.

Población, Estado y País: MÉXICO, D.F.

9) Teléfono (clave): 01 55 5671 7909 y 01 55 5483 7255    10) Fax (clave):

**III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO (S)**

11) Nombre (s) GEORGINA IBÁÑEZ MORALES    12) R.G.P.: DDAJ 09914

13) Domicilio calle número colonia y código postal: PROLONGACIÓN CANAL DE MIRAMONTES No. 3855, COLONIA EX-HACIENDA DE SAN JUAN DE DIOS, C.P. 14387

Población, Estado y País: MÉXICO, D.F.    14) Teléfono (clave): 0155 5483 4193 y 0155 5483 4194    15) Fax (clave): 0155 5483 4185

16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones:  
 ELA CASTRO VILLANUEVA    OPES BRISEIDA SILVA BADILLO

17) Denominación o Título de la Invención:  
 PROCEDIMIENTO PARA LA OXIDACIÓN ENANTIOSELECTIVA DEL (+) -4- CLOROBENCIDROL POR VÍA MICROBIOLÓGICA CON CÉLULAS EN REPOSO

18) Fecha de divulgación previa    19) Clasificación Internacional    uso exclusivo del IMPI

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_    \_\_\_\_\_

Día    Mes    Año

20) Divisiva de la solicitud    21) Fecha de presentación

\_\_\_\_    \_\_\_\_\_    \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Número    Figura jurídica    Día    Mes    Año

22) Prioridad Reclamada.    Fecha de presentación    No. de serie

\_\_\_\_ País    \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_    Día    Mes    Año



XXXVIII  
CONGRESO  
NACIONAL DE CIENCIAS  
FARMACÉUTICAS  
2005



Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.

Otorga la presente

# Constancia

A: **RAMÍREZ CAMACHO MARIO ALBERTO**

PREPARACIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS EN QUÍMICA FINA POR  
BIOTRANSFORMACIÓN: (R) -4- CLOROBENCIDROL

Por su participación en el III Internacional XXXVIII  
Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas 2005.

  
QFB María Guadalupe Satepa García-Herrera  
Presidenta

  
IQ Irma Romo Cábral  
Directora de Ciencia y Tecnología



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO**

**Casa abierta al tiempo**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
2º Reunión de Alumnos y Egresados de la  
Maestría en Ciencias Farmacéuticas**

**Otorgan la presente**

**CONSTANCIA**

**MARIO ALBERTO RAMÍREZ CAMACHO**

Por haber participado con el trabajo:

**“RESOLUCIÓN DEL (±)-4-CLOROBENCIDROL EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS.”**

México D.F a 9 de diciembre de 2005.

**Dr. CARLOS TOMÁS QUIRINO BARRERA**  
Coordinador de la M.C.F.

**Mtra. ROSA MA. NÁJERA NÁJERA**  
Directora de la División de C.B.S.